

Biochemische und physiologische Studien zur Funktion der GGDEF-EAL Proteine RmdA und RmdB in der Differenzierung von *Streptomyces venezuelae*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(*Dr. rer. nat.*)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Julian Haist

Dekan: Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Natalia Tschowri

2. Prof. Dr. Regine Hengge

3. Prof. Dr. Kürsad Turgay

Datum der Einreichung: 30.10.2020

Datum der Verteidigung: 04.02.2021

Vorwort

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Natalia Tschowri am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Die Arbeit wurde durch das Emmy Noether Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Dr. Natalia Tschowri gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Fachartikeln publiziert:

Al-Bassam, M. M., **J. Haist***, S. A. Neumann*, S. Lindenberg, and N. Tschowri. 2018. 'Expression Patterns, Genomic Conservation and Input Into Developmental Regulation of the GGDEF/EAL/HD-GYP Domain Proteins in *Streptomyces*', *Front Microbiol*, 9: 2524.

J. Haist**, S. A. Neumann**, M. M. Al-Bassam, S. Lindenberg, M. A. Elliot, and N. Tschowri. 2020. 'Specialized and shared functions of diguanylate cyclases and phosphodiesterases in *Streptomyces* development', *Mol Microbiol*. 2020;114:808–822.

* die Autoren teilen sich die Zweitautorenschaft, ** die Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Natalia Tschowri, welche mir die Möglichkeit gegeben hat in Ihrem Labor meine Promotion durchzuführen und mir stets als Mentorin und Ansprechpartnerin für fachliche Fragen zur Seite stand.

Auch bei meinen ehemaligen Kollegen Andreas Latoscha, Sara Neumann, Mirka Wörmann und Sandra Lindenberg sowie der ganzen AG Hengge und AG Eitingen möchte ich mich für den fachlichen Input und die viele interessante Gespräche bedanken.

Weiterhin möchte ich meiner gesamten Familie, Freunden und insbesondere Cindy Klettke für ihre Unterstützung während dieser intensiven Zeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Streptomyceten und ihre Eigenschaften	1
1.2 Bld und Whi als Hauptregulatorfamilien bei der Regulation der Entwicklung in <i>Streptomyces</i>	5
1.2.1 BldD als Hauptregulator der Entwicklung in <i>Streptomyces</i>	6
1.2.2 Weitere Bld-Regulatoren	7
1.2.3 Die Whi-Regulatorfamilie.....	9
1.3 C-di-GMP als globaler sekundärer Botenstoff in Bakterien	10
1.3.1 Auf- und Abbau von c-di-GMP.....	11
1.3.2 Domänen Konstellationen in PDEs und DGCs sowie Regulation deren Aktivität durch Sensordomänen	13
1.3.3 C-di-GMP Effektoren und c-di-GMP Bindedomänen	14
1.4 C-di-GMP in Streptomyceten.....	14
1.4.1 C-di-GMP metabolisierende Proteine in <i>Streptomyces venezuelae</i>	15
1.4.2 Vorausgegangene Untersuchungen zu RmdA und RmdB in <i>S. coelicolor</i> und RmdB _{gh} in <i>S. ghanaensis</i>	16
1.5 Zielsetzung.....	17
2 Ergebnisse.....	19
2.1 <i>In silico</i> Untersuchungen von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> sowie zu deren kodierenden Proteinen RmdA und RmdB aus <i>S. venezuelae</i>	19
2.1.1 RmdA und RmdB weisen beide eine intakte GG(D/E)EF- und EAL-Domäne auf und die kodierenden Gene sind in der Gattung <i>Streptomyces</i> stark konserviert	19
2.1.2 Das Gen <i>rmdB</i> aus <i>S. venezuelae</i> weist im Gegensatz zu seinen Homologen aus <i>S. coelicolor</i> und <i>S. ghanaensis</i> kein TTA-Kodon auf	20
2.2 <i>In vivo</i> Experimente zur Charakterisierung von RmdA und RmdB	21

2.2.1	Phänotypische Untersuchungen zur Entwicklung von <i>S. venezuelae</i> $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sowie Charakterisierung des Wachstumsverlaufs	21
2.2.2	Generierung von chromosomalen Mutationen in <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> sowie Komplementationsexperimente	30
2.2.3	Analyse der Expressionsmuster von <i>rmdA</i> -FLAG und <i>rmdB</i> -FLAG und Lokalisation von RmdA-FLAG, RmdB-FLAG, RmdA-mCherry sowie RmdB-mCherry innerhalb der Hyphen	33
2.3	<i>In vitro</i> Experimente zur Charakterisierung der enzymatischen Funktion von RmdA und RmdB und zur möglichen Regulation von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> durch BldD	38
2.3.1	RmdA und RmdB weisen <i>in vitro</i> Phosphodiesterase- und RmdA auch Diguanylatzyklaseaktivität auf.....	40
2.3.2	RmdB bevorzugt Mn^{2+} als Co-Faktor	42
2.3.3	RmdB bindet sowohl [^{32}P]c-di-GMP als auch [^{32}P]GTP	43
2.3.4	BldD bindet nicht an den Promotorregionen von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i>	45
2.4	Globale Analysen zur Charakterisierung von RmdA und RmdB	46
2.4.1	RmdA und insbesondere RmdB haben einen Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration in <i>S. venezuelae</i>	46
2.4.2	Die Deletion von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> hat signifikanten Einfluss auf das Transkriptom von <i>S. venezuelae</i>	50
2.4.3	Einige Ergebnisse der Transkriptomanalyse konnten durch qRT-PCR Experimente validiert werden	55
2.4.4	Folgeexperimente zu den Ergebnissen der globalen Analysen	57
2.5	Experimente zur Identifizierung von Interaktionspartnern von RmdA und RmdB	62
2.5.1	RmdB und σ^{WhiG} interagieren in Co-Elutionsstudien	62
2.5.2	RmdA und RmdB interagieren im <i>Bacterial-Two-Hybrid</i> Assay nicht mit WhiG oder RsiG	64
2.5.3	BldD, BldM, BldN, WhiG und RsiG werden bei Reinigung von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG über Affinitätschromatografie nicht co-eluiert.....	67
3	Diskussion	69
3.1	Die Gene <i>rmdA</i> und insbesondere <i>rmdB</i> sind in der Gattung <i>Streptomyces</i> hoch konserviert und kodieren für GG(D/E)F-EAL Tandemproteine, welche sich abseits der enzymaktivitätsvermittelnden Domänen grundlegend voneinander unterscheiden.....	69
3.2	Die Gene <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> werden über den gesamten Entwicklungszyklus exprimiert, wobei die Expression beider Gene nicht direkt von BldD reguliert wird und <i>rmdB</i> kein TTA-Kodon aufweist	70

3.3	Die Proteine RmdA und RmdB sind für die charakteristische Entwicklung von <i>S. venezuelae</i> essenziell und eine Deletion der Gene führt zu einer signifikanten Entwicklungsverzögerung	72
3.4	RmdA und RmdB zeigen <i>in vitro</i> Phosphodiesteraseaktivität und die <i>in vivo</i> Funktion von RmdA und RmdB beruht auf der Integrität des jeweiligen EAL-Motivs	74
3.4.1	RmdB fungiert als <i>Master</i> -PDE bei der Degradierung von c-di-GMP in <i>S. venezuelae</i>	77
3.5	Die Deletion von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> hat Einfluss auf das Transkriptom von <i>S. venezuelae</i>	78
3.5.1	Die Regulation der Expression der hydrophoben Bestandteile von Lufthyphen ist c-di-GMP abhängig	79
3.5.2	Auch die Einleitung und Regulation der Sporulation wird durch c-di-GMP reguliert	81
3.6	RmdB interagiert mit dem Sigmafaktor σ^{WhiG} in Co-Elutionsassays	82
3.7	Modell der Entwicklungsmodulation von <i>S. venezuelae</i> durch RmdA und RmdB ...	84
4	Material und Methoden	87
4.1	Bakterienstämme	87
4.2	Plasmide und Cosmide	89
4.3	Nährmedien	93
4.3.1	Flüssigmedien	93
4.3.2	Festmedien	94
4.3.3	Antibiotika	95
4.4	Kultivierung von Bakterienstämmen	96
4.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen	96
4.4.2	Bestimmung der Zelldichte von <i>E. coli</i> Stämmen.....	96
4.4.3	Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen.....	96
4.4.4	Kultivierung von <i>S. venezuelae</i> Stämmen	96
4.4.5	Herstellung von <i>S. venezuelae</i> Sporensammlungen	96
4.4.6	Bestimmung der koloniebildenden Einheit.....	97
4.4.7	Aufzeichnung von Wachstumskurven mit <i>S. venezuelae</i> Stämmen.....	97
4.5	DNA-basierende Methoden	97
4.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	97
4.5.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. venezuelae</i>	97
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	97
4.5.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	98

4.5.5	Kolonie-PCR	99
4.5.6	Generierung von Punktmutationen und Deletionen durch ortspezifische-Mutagenese	99
4.5.7	Gibson Assembly zur Generierung von pUT18C- <i>rmdB-rsiG</i>	99
4.5.8	Agarosegelelektrophorese, DNA-Färbung und DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	100
4.5.9	Restriktionsverdau	100
4.5.10	Ligation	100
4.5.11	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen und Elektrotransformation	101
4.5.12	TSS-Transformation.....	101
4.5.13	Generierung von chromosomalen Punktmutationen in <i>S. venezuelae</i>	102
4.5.14	Konjugation in <i>Streptomyces venezuelae</i>	103
4.5.15	Sequenzierung.....	104
4.5.16	DNA-Sequenzdesign und DNA-Sequenzvergleiche	104
4.5.17	Nukleotidextraktion.....	104
4.5.18	DNA-Oligonukleotide.....	106
4.6	RNA-basierende Methoden.....	111
4.6.1	Isolation der Gesamt-RNA aus <i>S. venezuelae</i> Makrokolonien.....	111
4.6.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA-Proben mittels Spektrophotometer.....	111
4.6.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA-Proben mittels automatisierter Elektrophorese.....	112
4.6.4	DNase I Verdau von RNA-Proben.....	112
4.6.5	Sequenzierung der Gesamt-RNA und Erstellung einer Transkriptomanalyse	112
4.6.6	qRT-PCR zur Validierung der Transkriptomanalyse	112
4.7	Protein-basierte Methoden	115
4.7.1	Überproduktion von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	115
4.7.2	Zellernte und Zellaufschluss aus <i>E. coli</i> Zellen.....	115
4.7.3	Proteinreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatografie	117
4.7.4	Proteinreinigung über Amylose-Affinitätschromatografie	117
4.7.5	Proteinreinigung über Glutathion-Affinitätschromatografie.....	118
4.7.6	Pufferaustausch und Dialyse.....	119
4.7.7	Zellaufschluss von <i>S. venezuelae</i> durch Homogenisierung.....	119
4.7.8	Zellaufschluss von <i>S. venezuelae</i> durch Hochdruckverfahren.....	120
4.7.9	Auftrennung von Zelllysate in Zellmembran- und zytosolische Fraktion.....	120
4.7.10	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	120

4.7.11	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE und Calibration-Kit	120
4.7.12	Konzentration von Proteinlösungen	121
4.7.13	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	121
4.7.14	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	123
4.7.15	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	123
4.7.16	Western Blot und Immunodetektion von Proteinen und Affinitätsmarkern.....	123
4.7.17	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	125
4.7.18	<i>In vitro</i> UV-Vernetzungsexperimente	126
4.7.19	Protein-DNA Interaktionsanalysen (EMSA)	126
4.7.20	Aminosäuresequenzvergleich und <i>in silico</i> Analyse der Domänenstruktur	127
4.7.21	Protein-Protein Interaktionsanalysen	127
4.8	Methoden zur phänotypischen Analyse von <i>S. venezuelae</i>	129
4.8.1	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	129
4.8.2	Herstellung von Makrokolonien und Hydrophobizitätstest	129
Referenzen		131
Anhang		139
Eidesstattliche Erklärung		146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Entwicklungszyklus von <i>S. venezuelae</i> .	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der an der Entwicklungsregulation beteiligten Bld -und Whi-Regulatoren sowie identifizierte Antisigmafaktoren.	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des c-di-GMP Metabolismus.	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von RmdA und RmdB.	20
Abbildung 5: Das Gen <i>rmdB</i> aus <i>S. venezuelae</i> weist im Gegensatz zu seinen Homologen aus <i>S. coelicolor</i> und <i>S. ghanaensis</i> kein TTA-Kodon auf.	21
Abbildung 6: Die Deletion von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> führt zu einer ausgeprägten Verzögerung der Entwicklung von <i>S. venezuelae</i> welche komplementiert werden kann.	23
Abbildung 7: $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ weisen auch in Flüssigkultur im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verzögerte Entwicklung auf.	25
Abbildung 8: <i>ftsZ-ypet</i> wird in $\Delta rmdA+$ <i>ftsZ-ypet</i> und $\Delta rmdB+$ <i>ftsZ-ypet</i> deutlich später als im WT exprimiert und nur im WT+ <i>ftsZ-ypet</i> und in $\Delta rmdB+$ <i>ftsZ-ypet</i> ist ein charakteristisches Lokalisierungsmuster zu erkennen.	28
Abbildung 9: Das Gen <i>ftsZ-ypet</i> wird zu Zeitpunkt 12 Stunden in $\Delta rmdA+$ <i>ftsZ-ypet</i> und $\Delta rmdB+$ <i>ftsZ-ypet</i> deutlich geringer exprimiert als in WT+ <i>ftsZ-ypet</i> .	29
Abbildung 10: $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zeigen hinsichtlich der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp einen identischen Wachstumsverlauf.	30
Abbildung 11: Die Mutation der jeweiligen kodierenden Sequenz für das EAL-Motiv von RmdA und RmdB führt zu denselben Entwicklungsphänotypen wie die Deletion der jeweiligen kodierenden Gene.	32
Abbildung 12: <i>rmdA</i> -FLAG und <i>rmdB</i> -FLAG werden im Zeitraum 8-20 Stunden nach Start der Kultivierung exprimiert.	34
Abbildung 13: RmdA-FLAG ist im Vergleich zu RmdB-FLAG auch in der zytosolischen Fraktion (ZF) detektierbar wohingegen RmdB-FLAG ausschließlich in der Membranfraktion (MF) detektierbar ist.	35
Abbildung 14: <i>rmdB-mCherry</i> wird stärker exprimiert als <i>rmdA-mCherry</i> und nur in $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ ist ein spezifisches Lokalisierungsmuster von RmdB-mCherry zu erkennen.	37
Abbildung 15: Grafische Übersicht der generierten Versionen von RmdA und RmdB, welche für <i>in vitro</i> Experimente eingesetzt wurden.	39
Abbildung 16: RmdA und RmdB weisen <i>in vitro</i> Phosphodiesteraseaktivität und RmdA zusätzlich Diguanylatzyklaseaktivität auf.	41
Abbildung 17: RmdB und RmdB ^{EAL} weisen mit Mn ²⁺ als Co-Faktor eine höhere Aktivität auf als mit Mg ²⁺ .	43
Abbildung 18: RmdB kann sowohl [³² P]c-di-GMP als auch [³² P]GTP binden.	44
Abbildung 19: His-BldD bindet nicht an den Promotorregionen von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> .	46
Abbildung 20: RmdB reguliert den globalen zellulären c-di-GMP-Spiegel über den gesamten Wachstumsverlauf, wohingegen RmdA in der frühen Entwicklungsphase Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration hat.	48

Abbildung 21: Die Deletion von <i>rmdA</i> und <i>rmdB</i> führt zu einer signifikanten differentiellen Regulation von insgesamt 457 Genen, darunter auch BldD-Zielgene.	51
Abbildung 22: Viele der in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differentiell regulierten Gene sind identisch.	52
Abbildung 23: Einige Gene, die für Faktoren und Regulatoren kodieren, welche einen Einfluss auf die Regulation der Entwicklung von <i>S. venezuelae</i> haben, sind in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differentiell reguliert.	53
Abbildung 24: Die Gene <i>bldM</i> und <i>chpE</i> in $\Delta rmdA$ sowie die Gene <i>chpC</i> und <i>chpH</i> in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind im Vergleich zum WT differentiell exprimiert.	56
Abbildung 25: Makrokolonien der Stämme $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind im Gegensatz zu <i>S. venezuelae</i> WT nach 48 Stunden nicht hydrophob.	58
Abbildung 26: Die konstitutive Expression von <i>chpD</i> , <i>chpE</i> , <i>chpF</i> und <i>chpH</i> unterdrückt partiell den Phänotyp von $\Delta rmdB$	59
Abbildung 27: Die konstitutive Expression von <i>bldM</i> und <i>bldN</i> führt zur Unterdrückung der Phänotypen von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$	61
Abbildung 28: GST-RmdB und His-WhiG werden sowohl bei Reinigung über Ni-NTA als auch bei Reinigung über Glutathion-Sepharose co-eluiert.	63
Abbildung 29: RmdA und RmdB zeigen im <i>Bacterial-Two-Hybrid</i> Assay keine Interaktion mit WhiG und RsiG.	66
Abbildung 30: BldD, BldM, BldN, RsiG und WhiG werden nicht mit RmdA-FLAG und RmdB-FLAG co-eluiert..	68
Abbildung 31: RmdA und RmdB modulieren durch ihre PDE-Aktivität den charakteristischen Entwicklungsverlauf von <i>S. venezuelae</i>	85
Abbildung 32: Das Gen <i>vnz_33670</i> weist eine hohe prozentuale Identität mit der SAM abhängigen Methyltransferase aus <i>Kitasatospora albolonga</i> auf.	140
Abbildung 33: Sequenzvergleich von <i>rmdB</i> aus <i>S. venezuelae</i> mit den homologen Genen aus <i>S. coelicolor</i> und <i>S. ghanaensis</i>	141
Abbildung 34: Ladekontrolle für den durchgeführten Western Blot mit anschließender Immunodetektion von FtsZ-Ypet.	142
Abbildung 35: Ladekontrolle für die durchgeführten Western Blots mit anschließender Immunodetektion von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG.	143
Abbildung 36: RmdA und RmdB zeigen in BTH-Experimenten keine Homodimerisierung.	144
Abbildung 37: Die Gene <i>bldM</i> , <i>bldN</i> und <i>whiI</i> sind in $\Delta rmdA$ signifikant und in $\Delta rmdB$ nicht signifikant herunterreguliert.	144
Abbildung 38: Silbernitratfärbung der per SDS-PAGE aufgetrennten Eluatfraktionen nach FLAG-Affinitätschromatografie aus <i>S. venezuelae</i> WT, $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG.	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Gene aus <i>S. venezuelae</i> , welche für putative c-di-GMP metabolisierende Proteine kodieren.	15
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	87
Tabelle 3: Verwendete Plasmide und Cosmide.....	89
Tabelle 4: Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen	95
Tabelle 5: Standard PCR-Ansatz mit <i>Q5-High Fidelity DNA-Polymerase</i> (NEB)	98
Tabelle 6: Standard PCR-Programm.....	98
Tabelle 7: DNA-Oligonukleotide	106
Tabelle 8: Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes.....	113
Tabelle 9: Verwendetes qRT-PCR-Programm.....	114
Tabelle 10: Zusammensetzung von SDS-Trenn –und Sammelgel verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen für zwei Gele.	122
Tabelle 11: Verwendete primäre -und sekundäre Antikörper	124
Tabelle 12: Pipettierschema für EMSA	139

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AIU	<i>Arbitrary Units</i>
Amp	Ampicillin
Apr	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A-Site	Active Site, aktives Zentrum
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BTH	Bacterial Two Hybrid
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	Bis-(3' - 5')-zyklisches dimeres Guanosinmonophosphat
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFU	<i>Colony-Forming-Units</i> , koloniebildenden Einheit
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
C-terminal	Carboxy-terminus
CTD	C-terminale Domäne
Cm	Chloramphenicol
CO	Kohlenmonoxid
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DGC	Diguanylatzyklase
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4,-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EtOH	Ethanol
ECF	<i>Extracytoplasmatic-Function</i>

F	Farad
fw	Forward
g	Gramm
GMP	Guanosinmonophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Horseradish Peroxidase
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
Hyg	Hygromycin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
I-Site	Inhibitory Site, inhibitorisches Zentrum
Kann	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LBnos	Lysogeny Broth ohne Salz
LC-MS/MS	Liquid-Chromatografie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
m	milli
M	Molar
MbP	Maltosebindeprotein
MCS	Multiple Cloning Site
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMR	<i>Methyl-Directed Mismatch Repair System</i>
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MYM	<i>Maltose Yeast-Extract Malt-Extract</i>
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Nalidixinsäure
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaI	Natriumhydroxid
NH ₄ SO ₄	Ammoniumsulfat
Ni-NTA	Nitrilotriessigsäure-Agarose
NO	Stickstoffmonoxid

nt	Nukleotid/e
N-terminal	Amino-Terminus
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
ORI	Open Reading Frame, Replikationsursprung
p	pico
PA	Polyacrylamid
PAC	<i>PAS-Associated</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim-Domäne
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGpG	lineares Diguanylat
qRT-PCR	<i>Quantitative-Real-Time-PCR</i>
PH	Phasenkontrast
PI	Protease-Inhibitor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rw	Reverse
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	Rounds Per Minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	<i>Soja Flour Manitol</i>
sog.	sogenannt
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TMA	Trimethylamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	<i>Transformation Storage Solution</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
WT	Wildtyp

X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
XRE	<i>Xenobiotic-Response-Element</i>
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro
Ω	Ohm

Zusammenfassung

Vertreter der Gattung *Streptomyces* sind als natürliche Quellen von diversen Sekundärmetaboliten wie Antibiotika und weiteren bioaktiven Molekülen bekannt, welche in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden. Die Erforschung von Streptomyceten hinsichtlich ihrer bioaktiven Sekundärmetabolite ist eng gekoppelt mit der Erforschung ihres komplexen Lebenszyklus, da die Synthese dieser Substanzen nur zu spezifischen Entwicklungszeitpunkten stattfindet und die komplexe Entwicklungsregulation von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird.

Die Entwicklung von Streptomyceten wird in drei Abschnitte gegliedert und beginnt mit dem vegetativen Wachstum durch die Ausbildung eines multizellulären Myzels. Der Hauptregulator der Entwicklung, BldD, blockiert als Transkriptionsregulator die Transition in die reproduktive Wachstumsphase auf Genebene, wobei die Aktivität von BldD von der Verfügbarkeit des ubiquitären sekundären Botenstoffs Bis-(3'-5')-zyklisches dimeres Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) abhängig ist. Weiterhin ist die Signalwirkung von c-di-GMP auch beim Übergang vom Lufthyphenwachstum zur Sporulation integriert, da auch der Antisigmafaktor von Sigmafaktor σ^{WhiG} , RsiG, als c-di-GMP-Effektor identifiziert werden konnte. C-di-GMP wird von Diguanylatzyklasen (DGC) generiert und von Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut, wodurch diesen Enzymen eine zentrale Rolle in der Entwicklungsregulation von Streptomyceten zu kommt.

In *S. venezuelae* dem *Streptomyces*-Stamm, welcher als Modellorganismus in dieser Arbeit genutzt wurde, finden sich zehn potenziell c-di-GMP metabolisierende Enzyme, von denen mit RmdA und RmdB zwei GGDEF-EAL-Tandem Proteine im Fokus dieser Arbeit stehen. Die Deletion der für RmdA und RmdB kodierenden Gene führt zu einer ausgeprägten Verzögerung der Entwicklung in *S. venezuelae*. Mit Hilfe chromosomaler Mutationen konnte das EAL-Motiv als essenziell für die *in vivo* Funktion von RmdA und RmdB identifizieren werden. Weiterhin konnten beide Proteine *in vitro* als aktive PDEs und RmdA als bifunktionales Enzym charakterisiert werden, welches neben der PDE- auch DGC-Aktivität aufweist. Mittels durchgeführter Nukleotidextraktion konnte RmdB als *Master*-PDE in *S. venezuelae* identifiziert werden, welche über den untersuchten Entwicklungsverlauf für die Hydrolyse von c-di-GMP verantwortlich ist. Aber auch RmdA hat während des Übergangs von der vegetativen zur reproduktiven Wachstumsphase Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration. Eine durchgeführte Transkriptomanalyse, qRT-PCR-Experimente und angelegte Folgeexperimente konnten zeigen, dass die Deletion von *rmdA* und *rmdB* zu einer differenziellen Expression von Genen führt, welche für wichtige entwicklungsspezifische Faktoren und Regulatoren kodieren. Infolgedessen wird sowohl die Synthese der hydrophoben

Schicht während der Ausbildung von Lufthyphen als auch der Übergang in die Sporulationsphase verzögert. Dies ist vermutlich auf die erhöhten c-di-GMP Konzentrationen in den Deletionsmutanten zurückzuführen, wobei BldD und RsiG den Übergang in die nächste Wachstumsphase verzögern.

Weiterhin konnte in Co-Elutionsexperimenten gezeigt werden, dass RmdB und σ^{WhiG} interagieren. Falls sich diese Erkenntnis bestätigen lässt, würde dies die erste direkte Interaktion eines c-di-GMP metabolisierenden Proteins mit einem entwicklungsregulatorischen Faktor darstellen.

Mit dieser Arbeit konnte ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der c-di-GMP Regulation selbst und deren Bedeutung in Bezug auf die Entwicklungsregulation von *S. venezuelae* geleistet werden. Außerdem haben sich aufgrund der Erkenntnisse dieser Arbeit neue Fragestellungen ergeben, welche Gegenstand von weiteren Arbeiten und Experimenten sein werden.

Abstract

Representatives of the genus *Streptomyces* are known as natural sources of various secondary metabolites such as antibiotics and other bioactive molecules, which are used in human and veterinary medicine. Research into *Streptomyces* about their bioactive secondary metabolites is closely linked to research into their complex life cycle, as the synthesis of these substances only takes place at specific developmental times and the complex developmental regulation is influenced by various factors.

The development of *Streptomyces* is divided into three phases and begins with vegetative growth through the formation of a multicellular mycelium. The main regulator of development, BldD, acts as a transcription regulator and blocks the transition into the reproductive growth phase at the gene level, whereby the activity of BldD depends on the availability of the ubiquitous secondary messenger substance bis (3'- 5') -cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP). Furthermore, the signaling effect of c-di-GMP is also integrated in the transition from aerial hyphae growth to sporulation, since the anti-sigma factor of sigma factor σ^{WhiG} , RsiG, could also be identified as a c-di-GMP effector. C-di-GMP is generated by diguanylate cyclases (DGC) and broken down by phosphodiesterases (PDE), which means that these enzymes play a central role in the developmental regulation of *Streptomyces*.

In *S. venezuelae* the *Streptomyces* strain, which was used as a model organism in this work, there are ten potentially c-di-GMP metabolizing enzymes, of which two GGDEF-EAL tandem proteins, RmdA and RmdB, are the focus of this work. The deletion of the genes coding for RmdA and RmdB leads to a pronounced delay in development in *S. venezuelae*. With the help of chromosomal mutations, the EAL motif could be identified as essential for the *in vivo* function of RmdA and RmdB. Furthermore, both proteins could be characterized *in vitro* as active PDEs and RmdA as a bifunctional enzyme, which has both PDE and DGC activity. RmdB was identified as the master PDE in *S. venezuelae* by means of nucleotide extraction, which is responsible for the hydrolysis of c-di-GMP over the course of development investigated. But also RmdA has an influence on the global cellular c-di-GMP concentration during the transition from the vegetative to the reproductive growth phase. A transcriptome analysis, qRT-PCR experiments and related follow-up experiments were able to show that the deletion of *rmdA* and *rmdB* leads to a differential expression of genes which code for important

development-specific factors and regulators. As a result, both the synthesis of the hydrophobic layer during the formation of aerial hyphae and the transition to the sporulation phase are delayed. This is presumably due to the increased c-di-GMP concentrations in the deletion mutants, with BldD and RsiG delaying the transition to the next growth phase.

Furthermore, it could be shown in co-elution experiments that RmdB and σ^{WhiG} interact. If this finding can be confirmed, this would represent the first direct interaction of a c-di-GMP metabolizing protein with a developmental regulatory factor.

With this work an important contribution to the understanding of the c-di-GMP regulation itself and its importance in relation to the developmental regulation of *S. venezuelae* could be made. In addition, the findings of this work have given rise to new questions which will be the subject of further work and experiments.

1 Einleitung

1.1 Streptomyceten und ihre Eigenschaften

Streptomyces bildet die artenreichste Gattung der Aktinobakterien, welche zusammen mit der Abteilung der Firmicuten den größten Teil der Gram-positiven Bakterien umfassen (Waksman and Henrici 1943; Bacterio.net/streptomyces 2020). Im Gegensatz zu den Firmicuten weisen Vertreter der Aktinobakterien charakteristischerweise einen hohen Anteil der Nukleinbasen Guanin und Cytosin in ihrer DNA auf. Streptomyceten bevölkern sowohl aquatische als auch terrestrische Lebensräume, sie sind aber insbesondere als Bodenbewohner bekannt (Hopwood 2007; Chater 2016). Als sogenannte Saprophyten spielen sie im Boden eine wichtige Rolle bei der Wiederverwertung organischer Materie und unlöslicher Substanzen (Hopwood 2007; Chater 2016). Hierzu generieren und sekretieren Streptomyceten verschiedene hydrolytische Enzyme wie Chitinasen und Zellulasen (Ventura et al. 2007). Vermutlich, um in dieser hoch kompetitiven Umgebung bestehen zu können, generieren Streptomyceten auch eine Vielzahl an bioaktiven Sekundärmetaboliten.

Unter diesen bioaktiven Sekundärmetaboliten finden sich Antibiotika und bioaktive Moleküle, welche in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden (Hopwood 2007; Procopio et al. 2012; Liu et al. 2013). Bereits in den 1940er Jahren wurden die ersten Antibiotika aus Streptomyceten isoliert, so konnte unter anderem *Streptomyces griseus* als Produzent für Streptomycin und *S. venezuelae* als Produzent für Chloramphenicol identifiziert werden (Procopio et al. 2012). Auch die Entdeckung von Tetracyclin, Neomycin, Vancomycin, Kanamycin, Actinorhodin und vielen weiteren wichtigen Antibiotika erfolgte in Vertretern der Streptomyceten (Procopio et al. 2012). Bis heute gelten Streptomyceten als wichtigste natürliche Quelle für bioaktive Moleküle und Antibiotika. So konnten kürzlich Gen-Cluster identifiziert werden, welche für die Synthese potenziell bioaktiver Sekundärmetabolite kodieren aber unter Laborbedingungen transkriptionell stillgelegt sind und deshalb bislang unerforscht blieben (Rigali et al. 2018). Im Kontext zu den zunehmend auftretenden Resistenzen gegen etablierte Antibiotika ist die Suche nach neuen antibiotischen Wirkstoffen eine essenzielle Aufgabe für die zukünftige Weltgesundheit. Dabei ist hervorzuheben, dass die Generierung von bioaktiven Sekundärmetaboliten mit dem Lebenszyklus der Streptomyceten korreliert, dessen Regulation ein weiteres wichtiges und komplexes Forschungsfeld darstellt.

Streptomyceten weisen im Vergleich zu vielen anderen Bakterien einen hoch komplexen Lebenszyklus auf, dessen Erforschung vor allem in *Streptomyces coelicolor* erfolgte. Seit einiger Zeit hat sich *Streptomyces venezuelae* als weiterer Modellorganismus etabliert, da dieser Stamm, im Gegensatz zu *S. coelicolor*, auch in Flüssigmedium Sporen bilden kann

(Bush et al. 2015). In Abbildung 1 ist der Lebenszyklus von *Streptomyces venezuelae* schematisch dargestellt sowie Makrokolonien von *Streptomyces venezuelae* zu den drei charakteristischen Entwicklungsphasen aufgeführt.

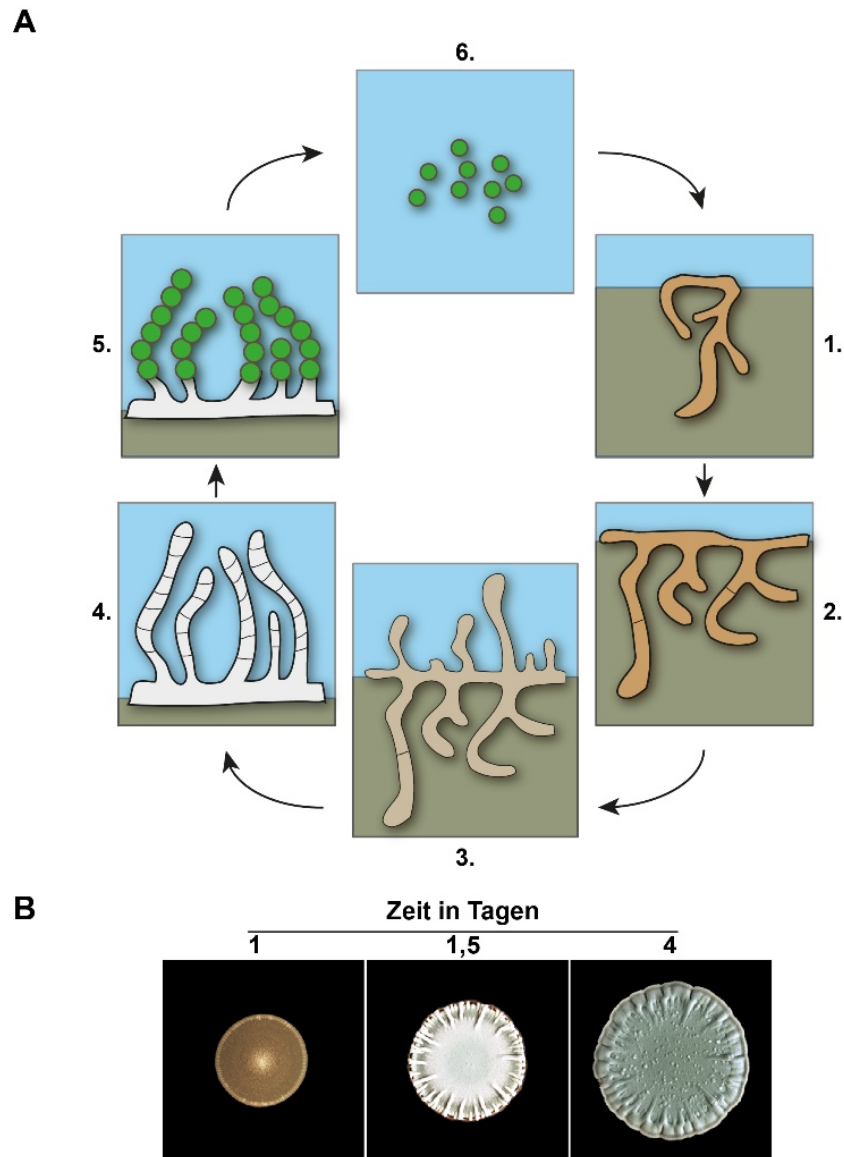


Abbildung 1: Der Entwicklungszyklus von *S. venezuelae*. **A:** Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *S. venezuelae*: 1. Initiierung des vegetativen Wachstums. 2. Ausbildung von vegetativen Hyphen im Nährmedium. 3. Ausbildung von hydrophoben Lufthyphen. 4. Septierung der Lufthyphen. 5. Sporulation. 6. Freisetzung der Sporen. **B:** Makrokolonien von *S. venezuelae* WT aufgenommen zu den Zeitpunkten 1, 1,5 und 4 Tage. Tag 1 zeigt *S. venezuelae* in der vegetativen Wachstumsphase. Zum Zeitpunkt 1,5 Tage ist die Ausbildung von weißem Luftmyzel zu erkennen und nach 4 Tagen ist die Sporulation abgeschlossen, was durch Grünfärbung der Kolonien sichtbar wird.

Der Lebenszyklus der Streptomyceten lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: vegetatives Wachstum, Ausbildung eines Luftmyzels und Sporulation. Deren Einleitung und Übergang wird durch eine Kaskade spezifischer Regulationsfaktoren gesteuert.

Der erste Abschnitt umfasst die Ausbildung eines vegetativen Myzels aus einer dormanten Spore. Dabei bilden sich aus einer keimenden Spore ein -oder mehrere Hyphen, welche röhrenartig aufgebaut sind und sich durch apikales Spitzenwachstum und Verästelungen am lateralen Hyphenkörper im Nährmedium ausbreiten (Flardh et al. 2012; Bush et al. 2015; Tschowri 2016). Das Längenwachstum wird durch das in der Hyphenspitze lokalisierte Polarisom gesteuert, welches die Proteine DivIVA und Scy umfasst (Bush et al. 2015). DivIVA bündelt dabei die Zellwand synthetisierenden Faktoren und bestimmt dadurch die Wachstumsrichtung (Flardh et al. 2012; Hempel et al. 2012). DivIVA wird dabei durch Scy unterstützt, welches als eine Art zelluläres Gerüst die beteiligten Komponenten stabilisiert (Holmes et al. 2013). Weiterhin wird ParA durch Scy an das Polarisom rekrutiert, welches im späteren Verlauf für die Aufteilung der Chromosomen zuständig ist (Ditkowski et al. 2013). Die Funktion von FilP, welches angrenzend an DivIVA und Scy lokalisiert ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet das FilP als eine Art Zytoskelett für die Stabilität und Formgebung der Hyphenspitze zuständig ist (Fuchino et al. 2013; Frojd and Flardh 2019). Die Integrität des Polarisoms und die Initiierung neuer Polarisome wird durch die Serin/Threonin-Proteinkinase AfsK auf Proteinebene gesteuert. Unter normalen Wachstumsbedingungen reguliert AfsK die Aktivität von DivIVA durch Phosphorylierung und kann durch spezifische Aktivierung neue laterale Polarisome initiieren, welche zu einer Verästelung der Hyphe führen. Weiterhin kann AfsK als Folge einer Stressantwort das vegetative Wachstum einstellen, wobei es hierbei zu einer Hyperphosphorylierung von DivIVA kommt, was zu einem Abbau des Polarisoms führt (Hempel et al. 2012). Das so entstehende vegetative Myzel ist multizellulär, wobei die filamentösen Zellen unregelmäßig durch Zwischenwände unterteilt werden und multiple Chromosomen-Kopien enthalten. Die in diesem Entwicklungsstadium gebildeten Zwischenwände führen nicht zu einer Separierung der einzelnen Zellen und scheinen für die Entwicklung nicht essenziell (McCormick et al. 1994). Streptomyceten in Kolonieform zeigen ein kahles Erscheinungsbild in der vegetativen Wachstumsphase (Tschowri 2016).

Die Einleitung der Differenzierung in die zweite Entwicklungsstufe, der Ausbildung eines Luftmyzels, ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Es konnten aber verschiedene Faktoren identifiziert werden, welche die Einleitung begünstigen. Darunter zählen äußere Einflüsse wie Nährstoffmangel und extrazelluläre Signale (Takano 2006; Flardh and Buttner 2009; McCormick and Flardh 2012).

Die Ausbildung der Lufthyphen stellt den Eintritt in die reproduktive Entwicklungsphase dar. Dabei entstehen unverzweigte Hyphen, welche von einer hydrophoben Schicht umgeben sind. Diese ermöglicht es die Oberflächenspannung zu durchbrechen, die wässrige Phase zu verlassen und in die Luft zu wachsen (Flardh and Buttner 2009). Die hydrophobe Schicht besteht aus sich selbst assemblierenden amyloidartigen Chaplin- und Rodlin-Proteinen (Elliot

et al. 2003; Claessen et al. 2003; Bibb et al. 2012). *S. venezuelae* sekretiert dabei zwei lange (ChpB und ChpC) -und fünf kurze Chaplinproteine (ChpD-H) (Bibb et al. 2012). Die vier von *S. venezuelae* sekretierten Rodlinproteine (RdIA-C) organisieren die Chaplin-Filamente in sogenannte *Rodlets*, sind aber für die Ausbildung der hydrophoben Schicht nicht essenziell (Claessen et al. 2002). Unter nährstoffreichen Wachstumsbedingungen wird das Peptid SapB zur Ausbildung der hydrophoben Schicht generiert (Willey et al. 1991; Kodani et al. 2004; Capstick et al. 2007). SapB ist ein Lantibiotika-Ähnliches Peptid ohne antibiotische Funktion, weist wie die Chaplin- und Rodlin-Proteine eine hohe Hydrophobizität auf und wird durch *ramS* kodiert und durch die Synthase RamC aufgebaut (Capstick et al. 2007; Flardh and Buttner 2009). Im Vergleich zur vegetativen Phase zeigen die Kolonien nun ein flaumig-weißes Erscheinungsbild.

Der dritte Entwicklungsabschnitt, die Sporulation, setzt durch synchrone Septierung der Lufthyphen ein. Dabei entstehen aus einer multigenomischen Lufthyphie bis zu 100 unigenomische Prä-Sporen (Flardh and Buttner 2009; Tschowri 2016). Die Septierung wird unter anderem durch die GTPase FtsZ, das bakterielle Tubulin Homolog, realisiert, welches zu diesem Zeitpunkt stark exprimiert wird (Flardh et al. 2000). FtsZ polymerisiert an den Septierungsstellen zu sogenannten *Z-Rings*, welche kontraktile Ringe darstellen und durch SsgA und SsgB lokalisiert und assembliert werden (Willemse et al. 2011; Jakimowicz and van Wezel 2012; Haeusser and Margolin 2016). Die aus FtsZ gebildeten kontraktilen Ringe sind innerhalb der Lufthyphen leiterartig angeordnet und stellen die Sporulationssepta dar (Haeusser and Margolin 2016). Die putative DNA-Translokase SffA ist neben ParA an der Segregation der Chromosomen in die Prä-Sporen beteiligt und wird von SmeA an die Septierungsstellen lokalisiert (Ausmees et al. 2007; Ditkowski et al. 2013). FtsK ist eine weitere DNA-Translokase, welche an der Segregation der Chromosomen beteiligt ist und zu diesem Zeitpunkt stark exprimiert wird (Ausmees et al. 2007; Bush et al. 2013). Weiterhin wird HupS, welches bei der Kondensierung der chromosomalen DNA beteiligt ist, während dieser Phase stark generiert (Salerno et al. 2009). Die Sporenreifung endet mit der Synthese von aus aromatischem Polyketid bestehenden Sporenpigmenten, welche die Kolonien von *Streptomyces coelicolor* grau und die von *Streptomyces venezuelae* grün erscheinen lässt (Kelemen et al. 1998; Tschowri 2016).

Die aromatischen Polyketide werden von Enzymen aufgebaut, welche in dem hochkonservierten *whiE-Cluster* kodiert sind. Das *whiE*-Cluster umfasst ein Operon von sieben Genen (*whiE*-ORFI-ORFVII), die für Proteine kodieren, welche für die Synthese der aromatischen Sporenpigmente essenziell sind (Kelemen et al. 1998). Diese Proteine ähneln Typ II Polyketid Synthasen, welche für die Synthese von aromatischen Antibiotika wie

beispielsweise Actinorhodin in *S. coelicolor* essenziell sind (Kelemen et al. 1998; Fernandez-Moreno et al. 1992).

Die dickwandigen dormanten Sporen werden nun freigesetzt und können im natürlichen Umfeld verbreitet werden. Sobald sie auf einen geeigneten Untergrund treffen, reifen sie zu einem neuen vegetativen Myzel heran (Bobek, Smidova, and Cihak 2017).

Kürzlich wurde eine neue Wachstumsform beobachtet, welche vom beschriebenen Wachstum abweicht. Dabei wurden verschiedene *Streptomyces* Stämme mit Hefen co-kultiviert, wobei *Streptomyces* lange unverzweigte vegetative Hyphen ausbildete, welche auf Festmedium eine rasche Kolonie-Expansion erlauben (Jones et al. 2017; Jones and Elliot 2018). Diese Wachstumsform wird als *Exploration Growth* also Erkundungswachstum bezeichnet und geht mit der Sekretion der flüchtigen organischen Substanz Trimethylamin (TMA) einher, welche einen Einfluss auf die Nahrungs- und insbesondere Eisenverfügbarkeit in der nahen Umgebung hat und den pH Wert deutlich steigert (Jones et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte von TMA das Wachstum von anderen Bakterien negativ beeinflussen und dass TMA das Erkundungswachstum anderer Streptomyceten initiiert (Jones et al. 2017; Jones et al. 2019).

1.2 Bld und Whi als Hauptregulatorfamilien bei der Regulation der Entwicklung in *Streptomyces*

Auch die Regulation der Entwicklung ist hoch komplex und wird durch Transkriptionsregulatoren, Sigmafaktoren auf Genebene und durch posttranslationale Modifikationen der beteiligten Faktoren auf Proteinebene gesteuert. Die sogenannte Bld- und Whi-Regulatorfamilien stellen dabei die zwei Hauptklassen an Regulatoren dar, welche die Entwicklung in *Streptomyces* steuern (Bush et al. 2015; Gallagher et al. 2020). In Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung der beteiligten Bld -und Whi-Regulatoren aufgeführt.

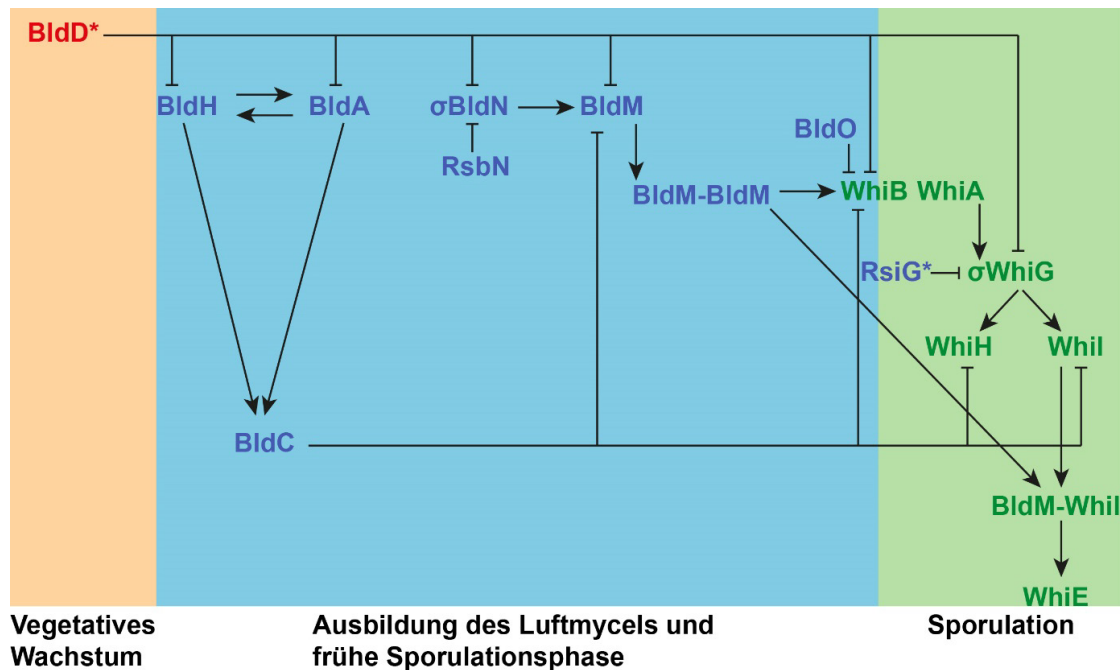


Abbildung 2: Schematische Darstellung der an der Entwicklungsregulation beteiligten Bld -und Whi-Regulatoren sowie identifizierte Antisigmafaktoren. Die Hintergrund- und die Schriftfarbe zeigen an, in welchem Entwicklungsschritt die jeweiligen Regulatoren agieren. Orange: Vegetatives Wachstum; Blau: Ausbildung von Lufthyphen; Grün: Sporulation. Mit einem * markierte Proteine sind identifizierte c-di-GMP-Effektoren.

Die in Abbildung 2 dargestellte Regulationskaskade wird in den folgenden Kapiteln 1.2.1, 1.2.2 und 1.2.3 detailliert beschrieben.

1.2.1 BldD als Hauptregulator der Entwicklung in *Streptomyces*

Der Transkriptionsregulator BldD gilt als Hauptregulator der Entwicklung in Streptomyceten. BldD agiert vor allem in der vegetativen Wachstumsphase und verhindert als Transkriptionsrepressor die Transition in die reproduktive Wachstumsphase (den Hengst et al. 2010; Tschowri et al. 2014). Es sind jedoch auch Beispiele bekannt, in welchen BldD die Expression von Zielgenen aktiviert (Yan et al. 2020). In *S. coelicolor* umfasst das Regulon von BldD über 167 Gene, darunter viele Regulatoren, welche für die Ausbildung des Luftmyzels und die Einleitung der Sporulation benötigt werden (den Hengst et al. 2010). In *S. venezuelae* wurden 282 Promotorregionen identifiziert, an welche BldD binden kann (Tschowri et al. 2014; Bush et al. 2015). Zu den wichtigsten von BldD regulierten Genen gehören die Bld-Regulatoren kodierenden Gene *bldA*, *bldH*, *bldM* und *bldN* (s. 1.2.2), die Whi-Regulatoren kodierenden Gene *whiB* und *whiG* (s. 1.2.3) sowie die Gene *ssgA*, *ssgB*, *ssgR*, *ftsZ* und *smeA-ssfA* (s. 1.1) (den Hengst et al. 2010; Tschowri et al. 2014; Bush et al. 2015). Die Deletion von *bldD* führt zu einem ausgeprägten Phänotyp, welcher sich unter anderem dadurch äußert, dass die Ausbildung des Luftmyzels übersprungen wird und die Sporulation direkt einsetzt (Tschowri et al. 2014; Schumacher et al. 2017). Dieses Phänomen wird auch als

Hypersporulations-Phänotyp bezeichnet, wobei auf Festmedium gewachsene Kolonien ein kahles Erscheinungsbild zeigen (Tschowri et al. 2014). Die entstehenden Sporen weisen kein Polyketid Sporenpigment auf (Tschowri et al. 2014).

BldD ist ein 18 kDa großes Protein, welches aus zwei Domänen besteht, die über einen flexiblen Linker verbunden sind (Elliot and Leskiw 1999). Die N-terminale DNA-Bindedomäne (DBD) weist ein *Xenobiotic-Response-Element* (XRE) beinhaltendes *Helix-Turn-Helix* (HTH) DNA-Bindungs-Motiv auf (Kim et al. 2006). Die C-terminale Domäne (CTD) besteht aus zwei β - α - α Strukturwiederholungen und einer kurzen C-terminalen α -Helix (Kim, Won, and Kang 2014; Tschowri et al. 2014; Schumacher et al. 2017). Die Aktivität von BldD selbst wird durch den sekundären Botenstoff Bis-(3'- 5')-zyklisches dimeres Guanosinmonophosphat (c-di-GMP, s. 1.3) gesteuert (Tschowri et al. 2014). C-di-GMP ist essenziell für die Dimerisierung von BldD, wobei tetrameres c-di-GMP zwei BldD-Moleküle über die CTD-Domäne von BldD miteinander verbindet (Tschowri et al. 2014; Schumacher et al. 2017). Dimerisiertes BldD bindet an pseudo-palindromische DNA-Stellen mit der Konsensussequenz 5'-TNAC(N)₅GTNA-3' (den Hengst et al. 2010).

BldD ist der einzige bislang bekannte c-di-GMP Effektor, welcher c-di-GMP in Form eines Tetramers bindet. Die Bindung von c-di-GMP an BldD erfolgt nach einem strikten Muster. Dabei wird das erste c-di-GMP Dimer an das RxxD-Motiv (Motiv II) von BldD gebunden wodurch BldD eine Konformationsänderung erfährt, welche die Bindung des zweiten c-di-GMP Dimers an das RxD-Motiv (Motiv I) von BldD begünstigt (Schumacher et al. 2017). Durch die Bindung des zweiten c-di-GMP Dimers erfährt BldD₂-(c-di-GMP)₄ eine weitere spezifische Konformationsänderung, in welcher der Protein-Nukleotid-Komplex fixiert bleibt (Schumacher et al. 2017). Mit dem Austausch der Asparaginsäure im Motiv-I durch Alanin (D116A) konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von BldD durch ein c-di-GMP Dimer *in vivo* nicht stabil ist und denselben Hypersporulations-Phänotyp hervorruft, der bei der Deletion von *bldD* beobachtet werden konnte (Schumacher et al. 2017).

1.2.2 Weitere Bld-Regulatoren

Neben BldD sind weitere Bld-Regulatoren für die Regulation der Entwicklung essenziell, welche ebenfalls die Transition der Entwicklung vom vegetativen Wachstum zur Ausbildung von Lufthyphen regulieren. Der Transkriptionsaktivator BldH bildet mit tRNA-*bldA*, der einzigen UUA-tRNA in *Streptomyces*, eine positive Rückkopplungsschleife (*feedback loop*) (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011). Dabei aktiviert BldH die Expression von *bldA*, wobei die Expression von *bldH* selbst von tRNA-*bldA* abhängig ist, da *bldH* ein TTA-Kodon aufweist (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011). Zusammen regulieren BldH und BldA die Expression des für den Transkriptionsregulators BldC kodierenden Gens *bldC*, welches auch ein TTA-

Kodon aufweist (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011). Das Regulon des MerR-ähnlichen Transkriptionsregulators BldC umfasst viele entwicklungsregulatorische Gene wie *bldM*, *bldC*, *whiB*, *whiD* und *whiH* (s. 1.2.2 und 1.2.3) sowie die Gene *smeA-ssfA* und *hupS* (s. 1.1), die für Faktoren kodieren, welche bei der DNA-Segregation und DNA-Kondensation essenziell sind (Schumacher, den Hengst, et al. 2018). Wie ersichtlich wird, decken sich einige Ziel-Gene von BldC mit den Zielgenen von BldD und werden von beiden Regulatoren reprimiert. BldC verhindert also wie BldD die Transition vom vegetativen Wachstum zur reproduktiven Wachstumsphase. Eine Deletion von *bldC* führt zu einer vorzeitigen Sporulation ohne die Ausbildung von Lufthyphen und auf Festmedium zu einem Kahlen-Kolonietyp (Bush 2018).

Der durch *bldN* kodierte Sigmafaktor σ^{BldN} aktiviert unter anderem die Transkription der *chp* - und *rdl*-Gene, welche bei der Ausbildung der Lufthyphen essenziell sind (Bibb et al. 2012). Weiterhin aktiviert σ^{BldN} die Transkription von *bldM*, welches für den Transkriptionsregulator BldM kodiert und das für den eigenen anti-Sigmafaktor RsbN kodierende Gen *rsbN* (Bibb, Molle, and Buttner 2000; den Hengst et al. 2010; Bibb et al. 2012). σ^{BldN} gehört zur Klasse der *Extracytoplasmatic-Function* (ECF) Sigmafaktoren und die Transkription von *bldN* wird direkt durch BldD reprimiert. Weiterhin wird σ^{BldN} durch den anti-Sigmafaktor RsbN durch Bindung inaktiviert (Bibb et al. 2012). RsbN ist an der Zellmembran lokalisiert und weist C-terminal einen Bereich auf, welcher extrazytoplasmatisch orientiert ist (Schumacher, Bush, et al. 2018). Vermutlich durch Signalweiterleitung eines bislang unbekannten Signals auf den extrazytoplasmatisch orientierten Bereich von RsbN wird die Bindung von σ^{BldN} gelöst, wodurch σ^{BldN} aktiviert wird (Schumacher, Bush, et al. 2018). Die Deletion von *rsbN* führt zu einer vorzeitigen Sporulation von *S. venezuelae* (Bibb et al. 2012).

Ein weiterer Vertreter der Bld-Regulatorfamilie ist BldM. Die Transkription von *bldM* wird durch BldD und BldC reprimiert und nach Inaktivierung von BldD durch σ^{BldN} aktiviert (den Hengst et al. 2010; Tschowri et al. 2014; Schumacher, den Hengst, et al. 2018). BldM ist ein Transkriptionsregulator welcher während des Lufthyphenwachstums als Homodimer die Transkription des sogenannten *Group I Gene Cluster* aktiviert (Al-Bassam et al. 2014). Zum *Group I Gene Cluster* gehören Gene wie *ssgR* und *whiB*, welche in der frühen Sporulationsphase benötigt werden (Al-Bassam et al. 2014). So aktiviert Transkriptionsregulator SsgR die Expression von *ssgA*, welches für SsgA kodiert und zusammen mit SsgB FtsZ lokalisiert und assembliert (Traag, Kelemen, and Van Wezel 2004; Willemse et al. 2011; Jakimowicz and van Wezel 2012; Haeusser and Margolin 2016). Die Funktion von WhiB wird in Abschnitt 1.2.3 erläutert. Im weiteren Verlauf der Sporulation bildet BldM ein Heterodimer mit WhiI, welche zusammen die Transkription des sogenannten *Group II Gene Clusters* aktivieren (Al-Bassam et al. 2014). Zum *Group II Gene Cluster* gehören Gene wie *smeA-ssfA* und *whiE* (s. 1.1 und 1.2.3), welche in der späten Sporulationsphase benötigt

werden (Al-Bassam et al. 2014). BldO wurde als MerR-ähnlicher Repressor identifiziert, dessen einziges Zielgen *whiB* darstellt (Bush et al. 2017). Die Transkription des Whi-Regulators WhiB wird also von zwei Bld-Regulatoren, BldD und BldO reprimiert.

Wie ersichtlich wird, erfolgt die Regulation durch die Bld-Regulatoren kaskadenartig mit BldD als Hauptrepressor, welcher auch die Aktivität der meisten untergeordneten Bld-Regulatoren kontrolliert. Einige Regulons der Bld-Regulatoren überlappen und unterscheiden sich in ihrem Einfluss, so dass die Regulation von Ziel-Genen vielschichtig und feinjustiert erfolgt.

1.2.3 Die Whi-Regulatorfamilie

Die Whi-Regulatorfamilie reguliert und initiiert die Sporenbildung. Der Name Whi resultiert vom englischen Wort *White* (weiß), was daher rührt, dass die Deletion vieler Whi-Regulator kodierender Gene zu einem weißen Erscheinungsbild von *Streptomyces* Kolonien führt, da diese im Stadium des Lufthyphenwachstums verharren und kein färbendes Polyketid gebildet wird.

WhiA und WhiB regulieren die frühe Phase der Sporulation (Bush et al. 2013; Bush et al. 2016; Bush et al. 2017). Sowohl WhiA als auch WhiB sind Transkriptionsfaktoren, welche kooperativ die Expression von Genen regulieren und dabei aufeinander angewiesen sind, so dass auch von WhiAB gesprochen werden kann (Bush et al. 2016). Da die Transkription von *whiA* autoreguliert wird, hängt die Aktivität von der Expression von *whiB* ab, welches von BldD und BldO reprimiert und von BldM aktiviert wird (den Hengst et al. 2010; Bush et al. 2013; Al-Bassam et al. 2014; Bush et al. 2017). Zu den Zielgenen gehören neben *whiG*, das für den Sigma-Faktor σ^{WhiG} (s.1.2.3) kodiert, auch *ftsZ*, *ftsK* und *filP* (s. 1.1)(Bush et al. 2013; Bush et al. 2016).

Sigma-Faktor σ^{WhiG} reguliert die Expression von *whiH* und *whiI* und damit indirekt die Expression von über 100 Genen, welche während der späten Sporulationsphase essenziell sind (Al-Bassam et al. 2014; Gallagher et al. 2020). Die Funktion von σ^{WhiG} wird durch den anti-Sigmafaktor RsiG inaktiviert, wobei die Bindung von σ^{WhiG} durch RsiG durch ein c-di-GMP Dimer realisiert wird (Gallagher et al. 2020). Damit wird die Regulation durch c-di-GMP neben der vegetativen Wachstumsphase (BldD) auch in der Sporulationsphase integriert. Die Deletion von *rsiG* führt zu einem Hypersporulations-Phänotyp wobei die vegetative Wachstumsphase zunächst normal erfolgt (Gallagher et al. 2020). Die von σ^{WhiG} regulierten Gene *whiH* und *whiI* kodieren ihrerseits für Transkriptionsregulatoren und sind in 98% der bereits sequenzierten Streptomyceten-Genomen konserviert (Gallagher et al. 2020).

WhiH weist als GntR-ähnlicher Transkriptionsfaktor ein großes Regulon an Sporulationswichtigen Genen auf (Persson, Chater, and Flardh 2013; Gallagher et al. 2020). WhiI bildet

wie in 1.2.2 beschrieben ein Heterodimer mit BldM aus, welches die Expression der Sporulations-wichtigen Gene *smeA-ssfA* und *whiE* aktiviert (Al-Bassam et al. 2014). WhiE aktiviert die Expression des sogenannten WhiE-Clusters, welches ein Operon mit sieben Genen umfasst (*whiE*-ORF1-ORFVII), die für Proteine kodieren, welche für die Synthese der aromatischen Sporenpigmente essenziell sind (s. 1.1) (Kelemen et al. 1998).

1.3 C-di-GMP als globaler sekundärer Botenstoff in Bakterien

Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP wurde zunächst als allosterischer Aktivator identifiziert, welcher die membrangebundene Zellulose-Synthase in *Acetobacter xylinum* aktiviert (Ross et al. 1987). C-di-GMP ist heute als universeller sekundär Botenstoff innerhalb der Bakterien anerkannt und in fast allen Phyla der Bakterien konnten Gene, welche für c-di-GMP metabolisierende Proteine kodieren, identifiziert werden (Jenal, Reinders, and Lori 2017; Romling, Galperin, and Gomelsky 2013). Seit seiner Entdeckung konnte der Einfluss von c-di-GMP auf die Regulation von verschiedenen zellulären Funktionen, wie Virulenz, Motilität, Zellzyklus, Biofilmproduktion, Zelldifferenzierung und vielen Weiteren, in Verbindung gebracht werden (Tamayo, Pratt, and Camilli 2007; Hengge 2009; Romling, Galperin, and Gomelsky 2013; Jenal, Reinders, and Lori 2017; Latoscha, Wormann, and Tschowri 2019).

C-di-GMP als Sekundärbotenstoff ist in der Domäne der Bakterien weitverbreitet, jedoch variiert die Anzahl der metabolisierenden Proteine je nach Familie und Art stark. So weist *V. vulnificus* mehr als 90 Gene auf, welche für putative c-di-GMP metabolisierende Proteine kodieren, wohingegen *S. aureus* nur ein einziges c-di-GMP metabolisierendes Protein aufweist (Holland et al. 2008; Romling, Galperin, and Gomelsky 2013). Die große Anzahl an Proteinen mit derselben potenziell c-di-GMP metabolisierenden Funktion in einem Stamm erschwert die Verknüpfung einzelner PDEs bzw. DGCs mit bestimmten zellulären Funktionen. So haben in *E. coli* nur einzelne c-di-GMP metabolisierende Proteine einen Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration, Andere bewirken jedoch bei chromosomaler Deletion ausgeprägte Phänotypen bezüglich der Biofilmproduktion (Sarenko et al. 2017).

1.3.1 Auf- und Abbau von c-di-GMP

Die Metabolisierung von c-di-GMP wird durch Proteine katalysiert, welche Diguanylatzyklase (DGC) -bzw. Phosphodiesterase-Aktivität (PDE) aufweisen (Jenal, Reinders, and Lori 2017). In Abbildung 3 ist der c-di-GMP Metabolismus schematisch dargestellt.

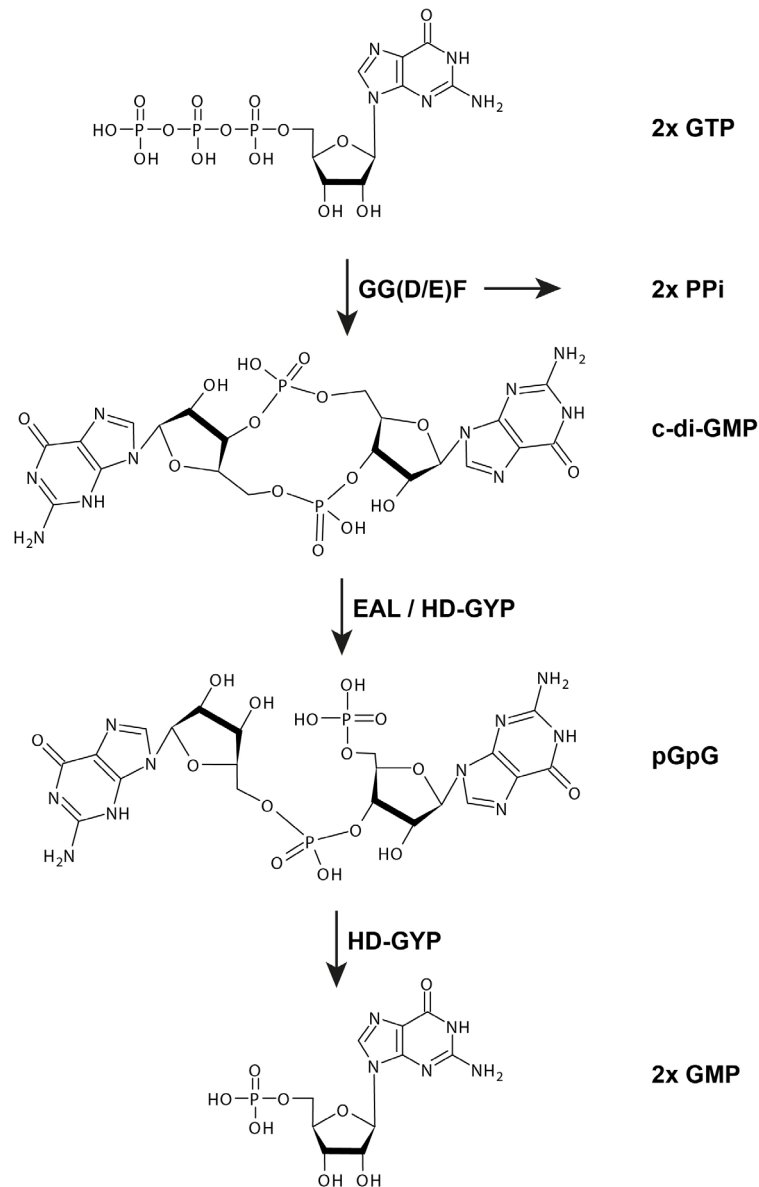


Abbildung 3: Schematische Darstellung des c-di-GMP Metabolismus. Diguanylatzyklasen, welche durch eine GG(D/E)F-Domäne charakterisiert sind, katalysieren die Kondensation von zwei GTP-Molekülen, wobei unter Abspaltung von zwei Pyrophosphat (PPi) Molekülen Bis-(3' - 5')-c-di-GMP generiert wird. Die Hydrolyse wird durch Phosphodiesterasen katalysiert, welche eine EAL- oder HD-GYP-Domäne aufweisen. Dabei hydrolysieren EAL-Phosphodiesterasen c-di-GMP normalerweise zu 5'-pGpG und HD-GYP-Phosphodiesterasen zu GMP. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch EAL-Domänen in der Lage sind, c-di-GMP zu GMP zu hydrolysieren.

Der Aufbau von c-di-GMP wird von Proteinen durchgeführt, welche eine GG(D/E)EF-Domäne aufweisen. Deren Name ist von dem hochkonservierten GG(D/E)EF-Motiv abgeleitet, welches

das aktive Zentrum (*A-Site*) des Enzyms darstellt (Pei and Grishin 2001; Linder 2006). Diguanylatzyklasen katalysieren die Kondensation von zwei GTP-Molekülen als Homodimere, wobei die Reaktion in zwei Stufen abläuft (Ross et al. 1987; Paul et al. 2007). Jeweils ein GTP-Molekül wird an den β - und γ -Phosphaten sowie an der Guaninbase von den beiden Gly-Resten des GG(D/E)EF-Motiv gebunden, welches eine β -*hairpin* Konformation einnimmt. Die Reste 3 und 4 (Asp/Glu und Glu) sind für die Koordination der Mg^{2+} oder Mn^{2+} Ionen verantwortlich, welche als Co-Faktoren für die Aktivität benötigt werden (Chan et al. 2004; Wassmann et al. 2007; Chou and Galperin 2016). Nach Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) entsteht 5'-pppGpG als Intermediärprodukt (Paul et al. 2007). Nach Abspaltung eines weiteren Pyrophosphats wird Bis-(3'- 5')-c-di-GMP generiert (Paul et al. 2007). Zur Regulierung der DGC-Aktivität weisen viele Diguanylatzyklasen N-terminal zur GGDEF-Domäne Sensordomänen auf (s. 1.3.2). Weiterhin beinhaltet die GG(D/E)EF -Domäne häufig eine Inhibitionsstelle (*I-Site*), welche fünf Aminosäuren Stromaufwärts des GG(D/E)EF-Motivs lokalisiert ist und aus einem RxxD-Motiv besteht (Christen et al. 2006). Die Bindung von c-di-GMP an die Inhibitionsstelle führt zu einer räumlichen Distanzierung der *A-Sites* innerhalb eines DGC-Dimers und stellt damit eine Rückkopplungsinhibierung dar (De et al. 2009).

Die Hydrolyse von c-di-GMP wird von Phosphodiesterasen katalysiert, welche eine EAL-Domäne oder eine HD-GYP-Domäne aufweisen. Das aktive Zentrum von Phosphodiesterasen mit EAL-Domäne stellt das namensgebende EAL-Motiv dar (Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005). Die EAL-Domäne hydrolysiert c-di-GMP standardmäßig zu 5'-pGpG und ist dabei auf zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Co-Faktoren angewiesen (Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005). In *in vitro* Enzymassays konnte jedoch beobachtet werden, dass manche EAL-Phosphodiesterasen 5'-pGpG weiter zu 2x GMP hydrolysieren können (Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005; Lindenberg et al. 2013). Anders als bei der Generierung von c-di-GMP durch DGCs, welche dazu zu Homodimeren interagieren müssen, kann die Hydrolyse von c-di-GMP auch von PDEs in monomerer Form durchgeführt werden, was jedoch die Ausnahme darstellt (Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005; Romling, Galperin, and Gomelsky 2013). Die Hydrolyse erfolgt durch eine Di-Metall-Katalyse, wobei ein $(Mg^{2+})_2$ - oder $(Mn^{2+})_2$ -*Cluster* zwei H_2O Moleküle koordiniert, von welchen eines bei dem hydrolytischen Angriff auf eine Phosphoesterbindung von c-di-GMP beteiligt ist (Tchigvintsev et al. 2010). Die EAL-Domäne stellt sich dabei als komplexer dar als die GG(D/E)EF-Domäne, wobei die Bindung von c-di-GMP und die Koordinierung des divalenten Metall-*Clusters* von vielen Aminosäureresten getragen wird. Als sicher gilt, dass die Glutaminsäure (Glu) im EAL-Motiv an der Koordinierung eines Metallions beteiligt ist (Tchigvintsev et al. 2010; Romling, Galperin, and Gomelsky 2013).

PDEs mit HD-GYP-Domäne sind bislang weit weniger erforscht als PDEs, welche eine EAL-Domänen aufweisen. Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass auch hier Metallionen als Co-Faktoren essenziell für die Aktivität der jeweiligen Enzyme sind und das c-di-GMP zu GMP hydrolysiert wird (Bellini et al. 2014).

1.3.2 Domänen Konstellationen in PDEs und DGCs sowie Regulation deren Aktivität durch Sensordomänen

Etwa 30% der Proteine, welche eine GG(D/E)EF-Domäne aufweisen, weisen zudem eine EAL-Domäne auf. Andersherum weisen etwa 60% aller Proteine mit EAL-Domäne zudem eine GG(D/E)EF-Domäne auf (Seshasayee, Fraser, and Luscombe 2010; Romling, Galperin, and Gomelsky 2013). Proteine, welche sowohl eine GG(D/E)EF als auch eine EAL-Domäne aufweisen, werden auch Tandem -oder Hybrid-Proteine genannt. Dennoch sind nur wenige bifunktionale Tandem-Proteine bekannt, welche sowohl durch PDE- als auch durch DGC-Aktivität charakterisiert sind. Beispiele hierfür sind BphG1 aus *Rhodobacter sphaeroides*, ScrC aus *Vibrio parahaemolyticus* oder MSDGC-1 aus *Mycobacterium smegmatis* (Tarutina, Ryjenkov, and Gomelsky 2006; Ferreira et al. 2008; Bharati et al. 2012). In den meisten Fällen ist die Funktion einer der beiden Domänen inaktiviert, was durch unterschiedliche Umstände bewirkt werden kann. Ein häufig auftretendes Phänomen ist, dass eine Domäne degeneriert vorliegt und dadurch enzymatisch inaktiv ist (Seshasayee, Fraser, and Luscombe 2010). Besonders häufig ist die GG(D/E)EF-Domäne in einem Tandemprotein enzymatisch inaktiv (Seshasayee, Fraser, and Luscombe 2010).

Neben einer genetisch bedingten Inaktivierung wird die Aktivität von PDEs und DGCs häufig durch Sensordomänen gesteuert, welche Teil des Proteins sind. Wie in 1.3.1 beschrieben, kann die I-Site von GG(D/E)EF-Domänen durch Bindung von c-di-GMP die DGC-Aktivität inhibieren und fungiert auch bei degeneriertem GG(D/E)EF-Motiv als c-di-GMP Rezeptor (Christen et al. 2006; Duerig et al. 2009). Entsprechend kann auch eine inaktive EAL-Domäne als c-di-GMP -oder ein degeneriertes GG(D/E)EF-Motiv als GTP Rezeptor fungieren (Christen et al. 2005; Navarro et al. 2009).

Weiterhin sind auch Bereiche an der Regulation der DGC oder PDE Aktivität beteiligt, welche nicht Teil der GG(D/E)EF- oder EAL-Domäne sind, meist N-terminal orientiert sind und spezifische Signale in den c-di-GMP Metabolismus integrieren können (Galperin 2004). Eine der häufigsten Sensordomänen, welche in Kombination mit GG(D/E)E- oder EAL-Domänen auftritt, ist die Per-Arnt-Sim (PAS) Domäne (Seshasayee, Fraser, and Luscombe 2010). Die PAS-Domäne ist durch eine konservierte dreidimensionale Struktur charakterisiert, mit welcher sie vielfältige Liganden binden kann (Henry and Crosson 2011; Schirmer 2016). Zu den Liganden gehören direkte Signale wie O₂, NO und CO oder indirekte Signale wie Redox-

Änderungen oder Licht. Bei den meisten PAS-Domänen sind die Signale jedoch noch unbekannt (Taylor and Zhulin 1999; Moglich, Ayers, and Moffat 2009). Ein Beispiel für die Regulation durch eine PAS-Domäne stellt das Protein AxDGC2 aus *Acetobacter xylinus* dar, welches Redox-Änderungen misst und bei Oxidation die DGC Aktivität stark erhöht (Qi et al. 2009). PAS-Domänen werden häufig von einer C-terminal orientierten *PAS-associated* (PAC)-Domäne begleitet, welche vermutlich die Faltung der PAS-Domäne unterstützt (Ponting and Aravind 1997).

1.3.3 C-di-GMP Effektoren und c-di-GMP Bindedomänen

Die Identifizierung von c-di-GMP Effektoren stellt sich anders als die Identifizierung von c-di-GMP metabolisierenden Proteinen häufig deutlich komplizierter dar. Die bereits in 1.3.1 und 1.3.2 beschriebenen I-Site und degenerierte EAL-Domänen finden sich auch außerhalb von c-di-GMP metabolisierenden Proteinen und integrieren c-di-GMP in die Regulation verschiedenster Funktionen (Navarro et al. 2009; Newell et al. 2011; Petters et al. 2012). Weiterhin ist die PilZ-Domäne die am besten erforschte c-di-GMP Bindedomäne. Durch die Bindung von c-di-GMP vermittelt die PilZ-Domäne eine Konformationsänderung des c-di-GMP-Effektorproteins, was dessen Funktion beeinträchtigen kann (Ryjenkov et al. 2006; Amikam and Galperin 2006). Beispiele für c-di-GMP Effektorproteine mit PilZ-Domänen sind BcsA und YcgR aus *E. coli*, welche bei der Regulation der Motilität und der Synthese von Zellulose essenziell sind (Ryjenkov et al. 2006; Morgan, McNamara, and Zimmer 2014).

In Streptomyceten wurden bislang keine Proteine mit PilZ-Domänen identifiziert. Neben diesen bekannten c-di-GMP bindenden Domänen existiert eine Vielzahl an c-di-GMP Effektoren, welche experimentell und nicht bioinformatisch identifiziert wurden, da die c-di-GMP Bindungsdomänen von den Bekannten deutlich abweichen. Unter den experimentell identifizierten c-di-GMP Effektoren finden sich viele Transkriptionsregulatoren wie das TetR-ähnliche Protein HpoR aus *Mycobacterium smegmatis*, das zur Crp-Transkriptionsregulatorenfamilie gehörende Protein Bcam1349 aus *Burkholderia cenocepacia* oder das NtrC-ähnliche Protein VspR aus *Vibrio cholerae* (Fazli et al. 2011; Srivastava et al. 2013; Li et al. 2018).

Weiterhin wurden c-di-GMP bindende RNA-Aptamere, auch als *Riboswitches* bezeichnet, identifiziert. Diese stellen regulatorische Regionen in mRNA dar, welche eine Prozessierung dieser erlauben (Lee et al. 2010).

1.4 C-di-GMP in Streptomyceten

Forschungsarbeiten in Streptomyceten führten zu wichtigen Entdeckungen von c-di-GMP-Effektoren. Dazu gehört der c-di-GMP-Effektor und Transkriptionsregulator BldD, welcher wie

in 1.2.1 beschrieben als Hauptregulator der frühen Entwicklungsphase der Streptomyceten gilt (Tschowri et al. 2014). Auch die kürzliche Identifizierung des c-di-GMP Effektors RsiG (s. 1.2.3), welcher als Anti-Sigmafaktor die Funktion von Sigmafaktor σ^{WhiG} reguliert und damit die c-di-GMP Signalisierung auch in die späte Entwicklungsphase der Streptomyceten integriert, gilt als Meilenstein in der Erforschung von c-di-GMP-Effektoren und deren Einfluss auf zelluläre Ereignisse (Gallagher et al. 2020).

1.4.1 C-di-GMP metabolisierende Proteine in *Streptomyces venezuelae*

In *Streptomyces venezuelae*, dem Stamm welcher im Fokus dieser Arbeit steht, wurden 10 chromosomale Gene und ein auf einem Plasmid lokalisiertes Gen identifiziert, welche für potenziell c-di-GMP metabolisierende Proteine kodieren (Al-Bassam et al. 2018). Die Gene sowie die entsprechenden Proteine sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der Gene aus *S. venezuelae*, welche für putative c-di-GMP metabolisierende Proteine kodieren. *enzymatische Aktivität unklar. ** charakterisiert in *S. coelicolor*.

Gen Name	vnz Nummer	Domänen-Struktur	Enzymatische Aktivität	Referenzen
<i>cdgA</i>	<i>vnz12760</i>	PAS-PAC-GGDEF-EAL	DGC**	(den Hengst et al. 2010)
<i>cdgB</i>	<i>vnz19920</i>	GAF-PAS-PAC-GGDEF	DGC**	(Tran et al. 2011)
<i>cdgC</i>	<i>vnz25635</i>	TM ₁₀ -PAS-PAC-GGDEF-degEAL	DGC	(Al-Bassam et al. 2018)
<i>cdgD</i>	<i>vnz19760</i>	GGDEF	DGC**	(Liu et al. 2019)
<i>cdgE</i>	<i>vnz22740</i>	GAF-GGDEF	DGC	(Haist et al. 2020)
<i>cdgF</i>	<i>vnz02140</i>	TM ₁₀ -PAS-PAC-GGDEF-EAL	*	(Al-Bassam et al. 2018)
<i>rmdA</i>	<i>vnz33675</i>	PAS-PAC-GGDEF-EAL	PDE**	(Hull et al. 2012)
<i>rmdB</i>	<i>vnz25525</i>	TM ₆ -GGDEF-EAL	PDE**	(Hull et al. 2012)
<i>hdgA</i>	<i>vnz24090</i>	TM ₆ -HD-GYP	PDE	Tschowri and Buttner, nicht publiziert

<i>hdgB</i>	<i>vnz24095</i>	TM ₆ -degHD-GYP	inaktiv	(Al-Bassam et al. 2018)
<i>pcdgG</i>	<i>Pvnz37430</i>	GGDEF	*	(Al-Bassam et al. 2018)

Die enzymatische Aktivität von CdgA und CdgB wurden bereits als DGCs -und RmdA sowie RmdB bereits als PDEs in *Streptomyces coelicolor* charakterisiert (den Hengst et al. 2010; Tran et al. 2011; Hull et al. 2012). Weiterhin konnte CdgC in *S. venezuelae* als DGC identifiziert werden (Al-Bassam et al. 2018). Die enzymatischen Funktionen von CdgF und CdgG sowie HdgA sind bislang nicht publiziert worden. Die Ergebnisse zu Experimenten mit RmdA sowie RmdB sind in den Kapiteln Ergebnisse und Diskussion aufgeführt. Mittels systematischer Deletion der kodierenden Gene in *S. venezuelae* konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *cdgB* und *cdgC* zu morphologischen Phänotypen führt (Al-Bassam et al. 2018). Die Deletion von *cdgB* führt im Vergleich zu *S. venezuelae* WT zu einer beschleunigten Entwicklung, wobei auf Festmedium bereits nach 30 Stunden Sporen gebildet werden (Al-Bassam et al. 2018). Dennoch durchläuft $\Delta cdgB$ alle Entwicklungsstufen und bildet grün-erscheinende Sporenpigmente aus (Al-Bassam et al. 2018). Die Deletion von *cdgC* führt zu einem ausgeprägten morphologischen Phänotyp, der sich in einem sehr flachen und faltigen Koloniebild auf Festmedium äußert. $\Delta cdgC$ entwickelt weder ein Luftmyzel noch färbt sich die Kolonie grün, es konnte jedoch gezeigt werden, dass $\Delta cdgC$ hypersporuliert und sich die Sporen direkt aus den vegetativen Hyphen entwickeln (Al-Bassam et al. 2018). Der Phänotyp ähnelt also jenem von $\Delta bldD$, $\Delta bldO$ (s. 1.2.1 und 1.2.2) oder der Überexpression des PdeH kodierenden Gens *pdeH* in *S. venezuelae* (Tschowri et al. 2014; Bush et al. 2017).

1.4.2 Vorausgegangene Untersuchungen zu RmdA und RmdB in *S. coelicolor* und RmdB_{gh} in *S. ghanaensis*

Sowohl in *S. coelicolor* als auch in *S. ghanaensis* wurden bereits Untersuchungen zu den homologen Proteinen RmdA und RmdB bzw. RmdB_{gh} durchgeführt. RmdA aus *S. coelicolor* umfasst 714 Aminosäuren und weist neben einer PAS- auch eine intakte EAL- und GG(D/E)F-Domäne auf. Das kodierende Gen *rmdA* (SCO0928) liegt in einem Operon mit SCO0929, wobei dessen Funktion bislang nicht geklärt wurde. RmdB aus *S. coelicolor* umfasst 746 Aminosäuren und weist 6 Transmembrandomänen sowie eine intakte EAL- und GG(D/E)F-Domäne auf. In *S. ghanaensis* umfasst RmdB_{gh} 763 Aminosäuren, wobei der strukturelle Aufbau, dem von RmdB aus *S. coelicolor* gleicht. Die in *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* für RmdB kodierenden Gene (SCO5495 und SSFG02196) enthalten jeweils ein TTA-Kodon, deren Translation in beiden Stämmen nur in Form der UUA-tRNA-bldA erfolgen kann (s. 1.2.2). Dadurch wird die Expression von *rmdB* vermutlich durch tRNA-bldA und BldH reguliert. Für die Expression von *rmdB_{gh}*, dem *rmdB* Homolog aus *S. ghanaensis*, konnte dies experimentell

bestätigt werden (Makitynsky et al. 2020). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsregulator MtrA an der Promotorregion von *rmdB* binden kann (Som et al. 2017). Wie in 1.4.1 beschrieben, wurden RmdA und RmdB aus *S. coelicolor* als reine PDEs charakterisiert (Hull et al. 2012). Auch in *S. ghanaensis* wurde RmdB_{gh} als PDE identifiziert (Makitynsky et al. 2020). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Deletion der für RmdA und RmdB kodierenden Gene, *rmdA* und *rmdB*, einen geringen Effekt auf die morphologische Entwicklung von *S. coelicolor* hat, wobei die Ausbildung des Luftmyzels leicht verzögert war. Erst die Deletion beider Gene führte zu einem ausgeprägten morphologischen Phänotyp, wobei kein Luftmyzel ausgebildet wird und auch keine Graufärbung festgestellt werden konnte. Die fehlende Graufärbung wurde als Anzeichen für das Ausbleiben der Sporulation herangezogen (Hull et al. 2012). In *S. ghanaensis* führte die Deletion von *rmdB*_{gh} zu einer verzögerten Entwicklung, wobei $\Delta rmdB_{gh}$ auch nach fünf Tagen Inkubation auf Festmedium keine Sporen ausbildet (Makitynsky et al. 2020). Eine Analyse der zellulären c-di-GMP Konzentration in *S. coelicolor* $\Delta rmdA$, $\Delta rmdB$, der Doppelmutante sowie in *S. coelicolor* WT ergab, dass zwischen $\Delta rmdA$, $\Delta rmdB$ und dem WT keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Nur in der Doppelmutante konnte eine signifikante Erhöhung der zellulären c-di-GMP Konzentration festgestellt werden (Hull et al. 2012). Entsprechend wurde die Hypothese aufgestellt, dass RmdA und RmdB lokal agieren müssen und evtl. eine Interaktion mit einem c-di-GMP Effektorprotein eingehen. Untersuchungen zur PAS-Domäne (s. 1.3.2) von RmdA ergaben, dass diese Häm bindet und durch Oxidation bzw. Reduktion eine Veränderung im Absorptionsspektrum festgestellt werden kann (Hull et al. 2012). Dies konnte auch durch Supplementierung von Sauerstoff (O₂) und Kohlenmonoxid (CO) erreicht werden, wobei hier keinen Einfluss durch den Redox-Zustand auf die Aktivität von RmdA festgestellt werden konnte (Hull et al. 2012). In *S. ghanaensis* führt die Deletion von $\Delta rmdB_{gh}$ zu einem Anstieg der zellulären c-di-GMP Konzentration und wirkt sich positiv auf die Produktion des Antibiotikums Moenomycin A aus (Makitynsky et al. 2020). Dieser Nebeneffekt in Form einer gesteigerten Produktion von sekundären Metaboliten im Zusammenhang mit der Deletion von *rmdB* konnte auch in *S. albus* identifiziert werden (Makitynsky et al. 2020).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit waren die umfangreiche Charakterisierung von RmdA und RmdB sowie Untersuchungen zu deren Einfluss auf die Entwicklungsregulation von *S. venezuelae*.

Dazu sollten zunächst mittels vergleichender Wachstumsanalysen und phänotypischer Bestimmungen die Auswirkungen einer Deletion von *rmdA* und *rmdB* auf die Entwicklung von *S. venezuelae* *in vivo* untersucht werden. Diese phänotypischen Untersuchungen sollten durch

vergleichende Analysen der Expression von fluoreszenzmarkierten Entwicklungsmarkern auf molekularer Ebene unterstützt werden. Durch chromosomale Mutationen in den GGDEF- und EAL-Motiv kodierenden Sequenzabschnitten von *rmdA* und *rmdB* sollten Rückschlüsse auf die Funktion von RmdA und RmdB *in vivo* gezogen werden.

Die Bestimmung der enzymatischen Funktionen von RmdA und RmdB sollte *in vitro* mittels Diguanylatzyklase- und Phosphodiesterase-Assays erfolgen.

Um den Einfluss von RmdA und RmdB auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration im Verlauf der Entwicklung von *S. venezuelae* untersuchen zu können, sollten Nukleotidextraktionen aus *S. venezuelae* WT und den Deletionsmutanten $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ durchgeführt und miteinander verglichen werden.

Inwiefern sich die Deletion von *rmdA* und *rmdB* auf das Transkriptom von *S. venezuelae* auswirkt, sollte mit einer, auf mRNA-Sequenzierung basierenden, Transkriptomanalyse untersucht werden. Dabei sollte insbesondere die Expression von Genen untersucht werden, welche für wichtige Faktoren der Entwicklungsregulation kodieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit stellte die Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern von RmdA und RmdB dar. Dazu sollte mittels Co-Elutions- sowie *Bacterial-Two-Hybrid*-Experimenten eine Detektion von Interaktionspartnern ermöglicht werden.

Die Experimente dieser Arbeit sollen dazu beitragen, das Verständnis der c-di-GMP Regulation in *S. venezuelae* zu vertiefen und dessen Verknüpfung mit der Entwicklungsregulation besser zu verstehen.

2 Ergebnisse

2.1 *In silico* Untersuchungen von *rmdA* und *rmdB* sowie zu deren kodierenden Proteinen RmdA und RmdB aus *S. venezuelae*

Die Charakterisierung der Proteine RmdA und RmdB ist das Ziel dieser Arbeit. Im Folgenden sollen die kodierenden Gene *rmdA* und *rmdB*, ihre Einordnung in das Genom sowie die Domänen-Struktur der Proteine untersucht werden. Außerdem sollen Sequenzvergleiche von *rmdA* und *rmdB* Aufschluss darüber geben, inwiefern beiden Gene in der Gattung *Streptomyces* konserviert sind und ob *rmdB* aus *S. venezuelae* ein TTA-Kodon aufweist.

2.1.1 RmdA und RmdB weisen beide eine intakte GG(D/E)EF- und EAL-Domäne auf und die kodierenden Gene sind in der Gattung *Streptomyces* stark konserviert

Die Gensequenzen von *rmdA* und *rmdB* aus *S. venezuelae* wurden in der aktuellen Annotationsform von der *Streptomyces*-Annotations-Datenbank *StrepDB* (s. 4.5.16) geladen. Das für RmdA kodierende Gen *rmdA* (*vnz33675*) ist 2166 Basenpaare (bp) lang und liegt mit dem Gen *vnz33670* in einem Operon, wobei der Promotor stromaufwärts von *vnz33670* lokalisiert ist. Das Gen *rmdA* kodiert für 721 Aminosäuren. Das für RmdB kodierende Gen *rmdB* (*vnz25525*) ist 2115 bp lang, weist einen eigenen Promotor auf und kodiert für 704 Aminosäuren.

Pan-Genom Analysen, welche in Kooperation mit Mahmoud Al-Bassam durchgeführt wurden, ergaben, dass das Gen *rmdB* in 91 von 93 vollständig sequenzierten Streptomyceten Genomen identifiziert werden konnte (Al-Bassam et al. 2018). Das für RmdA kodierende Gen *rmdA* konnte in 82 *Streptomyces* Stämmen identifiziert werden und co-existiert in 81 Stämmen zusammen mit *rmdB* (Al-Bassam et al. 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *rmdA* immer in Kombination mit *vnz33670* auftritt. Sequenzvergleiche zu dem von *vnz33670* kodierten Protein ergaben (s. Abbildung 32), dass es sich hierbei um ein in *S. venezuelae* uncharakterisiertes Protein handelt, welches eine hohe prozentuale Identität mit einer S-adenosyl-L-methionine (SAM) abhängigen Methyltransferase aus *Kitasatospora albolonga* aufweist.

Mittels der Online-Datenbank SMART (s. 4.7.20) wurde die Domänenstruktur anhand der Aminosäuresequenz von RmdA und RmdB analysiert. In Abbildung 4 sind die Domänen-Strukturen der Proteine RmdA und RmdB grafisch dargestellt.

A



B

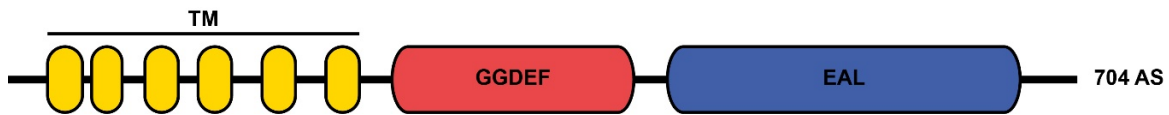


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von RmdA und RmdB. A: RmdA enthält einen 162 Aminosäure langen unspezifischen N-terminalen Bereich, an welchen eine PAS-PAC-Domäne anschließt. Folgend findet sich eine GG(D/E)EF-Domäne mit intaktem GGDEF-Motiv und anschließend eine EAL-Domäne mit intaktem EAL-Motiv. B: RmdB weist N-terminal sechs Transmembrandomänen (TM) auf, an welche eine GG(D/E)EF-Domäne mit intaktem GGDEF-Motiv und anschließend eine EAL-Domäne mit intaktem EAL-Motiv folgt.

Das Protein RmdA ist 78.7 kDa groß und umfasst einen ca. 17 kDa langen unspezifischen N-terminalen Bereich. Dieser weist weder Homologien zu bekannten Domänen noch Auffälligkeiten in seiner Zusammensetzung der Aminosäuren, z. B. bezüglich Hydrophobizität auf. An diesen Bereich schließt eine PAS-PAC-Domäne an, welche 13 kDa umfasst. Der PAS-PAC-Domäne folgt eine GG(D/E)EF-Domäne mit intaktem GGDEF-Motiv und degeneriertem I-Site Motiv (GxxE). Weiterhin enthält RmdA eine EAL-Domäne mit intaktem EAL-Motiv.

Das Protein RmdB ist 75,04 kDa groß und weist N-terminal sechs Transmembrandomänen (TM) auf, an welche die GG(D/E)EF -Domäne mit intaktem GGDEF-Motiv und degeneriertem I-Site Motiv (PxxA) anschließt. Nachfolgend enthält RmdB eine EAL-Domäne mit intaktem EAL-Motiv.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Gene *rmdA* und *rmdB* in der Gattung *Streptomyces* stark konserviert sind und dass RmdA und RmdB aus *S. venezuelae* sogenannte Tandem-Proteine sind, welche sowohl eine intakte GG(D/E)F- als auch eine intakte EAL-Domäne aufweisen.

2.1.2 Das Gen *rmdB* aus *S. venezuelae* weist im Gegensatz zu seinen Homologen aus *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* kein TTA-Kodon auf

Bei den Untersuchungen zu den *rmdB* Homologen aus *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* konnte gezeigt werden, dass diese jeweils ein TTA-Kodon in ihrer Gensequenz aufweisen, wodurch die Expression von *rmdB* in diesen Stämmen von der raren UUA-tRNA-*bldA* abhängig ist (Hull et al. 2012; Makitrynssky et al. 2020). Die Expression von *bldA* wird wiederum von BldH aktiviert. Mit diesem bildet *bldA* eine positive Rückkopplungsschleife aus, da auch *bldH* ein TTA-Kodon aufweist (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011). Die Expression von *bldA* als auch

verglichen. Weiterhin wurden die Wachstumsparameter (s. 4.4.7) der Deletionsstämmen mit dem WT verglichen.

2.2.1.1 Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* in *S. venezuelae* führen zu einer stark verzögerten Entwicklung auf Festmedium

In diesem Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Deletion von *rmdA* und *rmdB* auf die Entwicklung von *S. venezuelae* hat. Dazu wurden die Stämme SVNT27 (im weiteren Verlauf $\Delta rmdA$ genannt) und SVNT26 (im weiteren Verlauf $\Delta rmdB$ genannt) (s. Tabelle 2) auf MYM-Agar als Makrokolonien kultiviert (s. 4.3.2 und 4.8.2). Weiterhin wurden die Stämme $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG mitgeführt (s. Tabelle 2). In diesen Stämmen sollte die Deletion von *rmdA* und *rmdB* durch Expression einer, mit einem FLAG-Affinitätsmarker fusionierten, Version von *rmdA* und *rmdB* komplementiert werden. Die Gene *rmdA* und *rmdB* wurden mitsamt ihrer jeweiligen nativen Promotorsequenz in p3xFLAG kloniert und die resultierenden Plasmide p3xFLAG-*rmdA* und p3xFLAG-*rmdB* (s. Tabelle 3) mittels Konjugation in die integrative Phagenstelle $attB_{\phi BT1}$ von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ eingefügt (s. 4.5.14). *S. venezuelae* WT wurde als Kontrolle und zum Vergleich der charakteristischen Entwicklung mitgeführt. In Abbildung 6A und B sind die generierten Makrokolonien aufgeführt, welche über einen Zeitraum von 5 Tagen auf MYM-Agar kultiviert wurden.

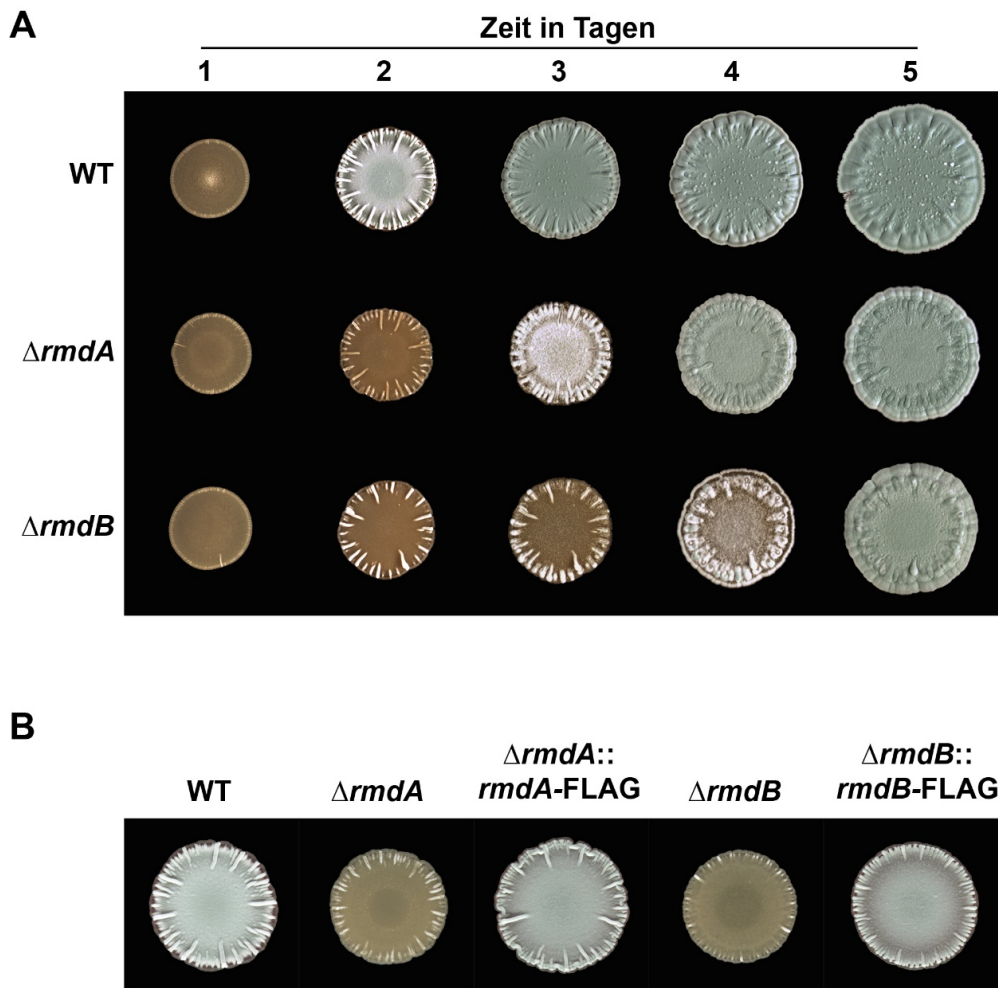


Abbildung 6: Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* führt zu einer ausgeprägten Verzögerung der Entwicklung von *S. venezuelae* welche komplementiert werden kann. A: Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kultiviert auf MYM-Agar über einen Zeitraum von 5 Tagen. *S. venezuelae* WT beginnt nach 2 Tagen mit der Ausbildung von weißen Lufthyphen und nach 3 Tagen ist die Ausbildung von Sporen durch Grünfärbung zu erkennen. In $\Delta rmdA$ beginnt die Ausbildung von Lufthyphen nach 3 Tagen und nach 4 Tagen ist die Ausbildung von Sporen durch Grünfärbung zu erkennen. In $\Delta rmdB$ ist nach 4 Tagen die Ausbildung von Lufthyphen durch die weiße Färbung der Kolonien und nach 5 Tagen die Ausbildung von Sporen durch Grünfärbung der Kolonien erkennbar. **B:** Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$, $\Delta rmdB$, $\Delta rmdA::rmdA\text{-FLAG}$ und $\Delta rmdB::rmdB\text{-FLAG}$ kultiviert auf MYM-Agar und fotografiert nach 2 Tagen. Die Konjugation von mit einem FLAG-Affinitätsmarker versehenen Versionen von *rmdA* und *rmdB* in die *attB_{ΦBT1}* Phagenstelle kann den Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ vollständig komplementieren. Alle Makrokolonien wurden durch das Tropfen von 12 μ l 2×10^5 CFU/ μ l auf MYM-Agar kultiviert.

Wie aus Abbildung 6A hervorgeht, zeigen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ im Vergleich zu *S. venezuelae* WT einen morphologischen Phänotyp hinsichtlich ihrer Entwicklungsgeschwindigkeit. Der WT beginnt, nach eintägigem vegetativem Wachstum, bereits nach 2 Tagen mit der Ausbildung von Lufthyphen, welche die Makrokolonie mit einem weißen Flaum bedecken. Nach 3 Tagen ist eine Grünfärbung der WT Makrokolonie erkennbar, welche die Einleitung der Sporulation anzeigt. Im weiteren Verlauf setzt sich die Sporulation fort und die Makrokolonien sind zunehmend dunkelgrün gefärbt. Im Vergleich zum WT ist die Entwicklung von $\Delta rmdA$ um ca. einen Tag verzögert, bildet erst nach 3 Tagen Lufthyphen und nach einem weiteren Tag

Sporen, welche die Makrokolonien grün färben. Die Entwicklung von $\Delta rmdB$ ist im Vergleich zum WT ca. zwei Tage verzögert und beginnt erst nach vier Tagen mit der Ausbildung von Lufthyphen. Nach fünf Tagen zeigt sich auch in $\Delta rmdB$ durch Grünfärbung der Makrokolonien die Einleitung der Sporulation.

Wie aus Abbildung 6B hervorgeht, kann der ausgeprägte Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ durch Expression von mit FLAG-Affinitätsmarkern fusionierten Varianten von *rmdA* und *rmdB* vollständig komplementiert werden. Nach zwei Tagen bilden die Komplementationsstämme gleichzeitig mit *S. venezuelae* WT Lufthyphen aus, welche die Kolonien weiß erscheinen lassen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletionen der für die Proteine RmdA und RmdB kodierenden Gene *rmdA* und *rmdB* zu einer signifikant verzögerten Entwicklung von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ im Vergleich zum WT führen. Die morphologischen Phänotypen ähneln sich dabei stark, sie sind jedoch nicht identisch. Beide Deletionsstämme durchlaufen, mit Verzögerung, alle charakteristischen Entwicklungsschritte von *S. venezuelae*. Durch Expression von, mit FLAG-Affinitätsmarkern fusionierten Varianten von *rmdA* und *rmdB* kann der jeweilige Phänotyp in beiden Fällen vollständig komplementiert werden.

2.2.1.2 Die Wachstumsverzögerung von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ ist auch in Flüssigkultur ausgeprägt

Im Gegensatz zu anderen Streptomyceten Vertretern ist *S. venezuelae* in der Lage in Flüssigmedium Sporen zu bilden, wobei die einzelnen Entwicklungsschritte deutlich schneller ablaufen als auf MYM-Festmedium. Das vegetative Wachstum in Flüssigmedium geht einher mit der Ausbildung langer, verzweigter Hyphen, welche mit dem Einsetzen der reproduktiven Wachstumsphase zunehmend zu kurzen unverzweigten Hyphen fragmentieren. Diese Fragmente entwickeln sich zu Sporenketten, welche im weiteren Verlauf zu einzelnen Sporen zerfallen.

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob der auf Festmedium ausgeprägte Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ (s. 2.2.1.1) auch in Flüssigkultur festgestellt werden kann. Dazu wurde *S. venezuelae* WT sowie $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ in MYM-Medium (s. 4.3.1 und 4.4.4) kultiviert und über einen Zeitraum von 12-36 Stunden mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen aufgenommen (s. 4.8.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 7 aufgeführt.

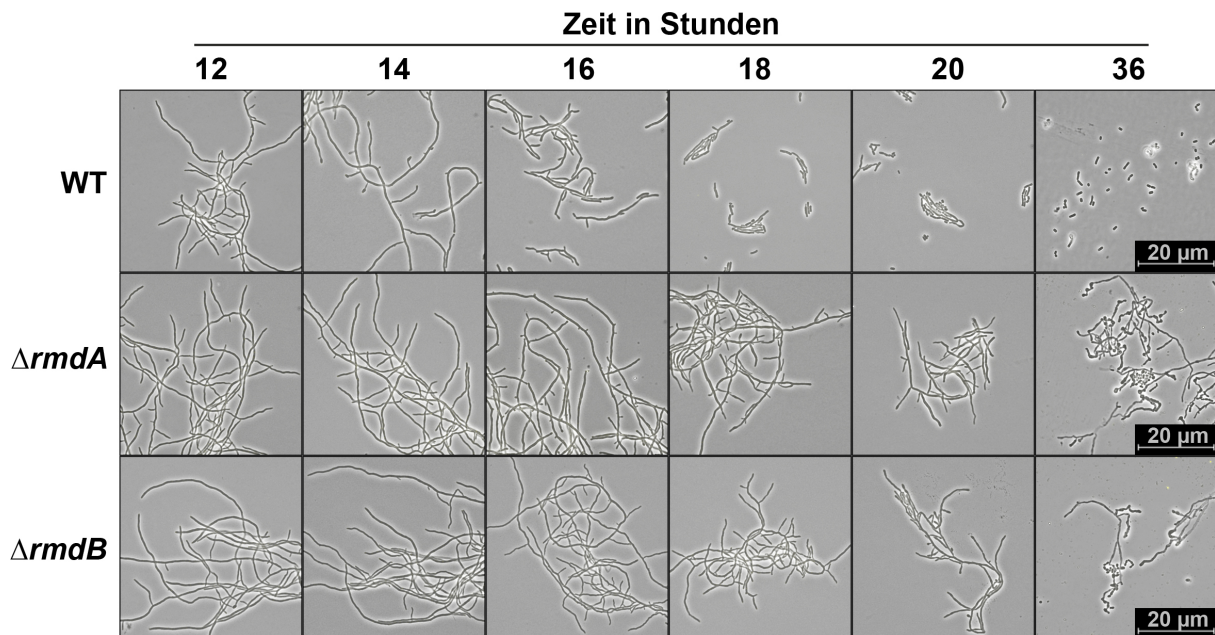


Abbildung 7: $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ weisen auch in Flüssigkultur im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verzögerte Entwicklung auf. *S. venezuelae* WT beginnt nach 16 Stunden mit der Fragmentierung von Hyphen, welche im weiteren Verlauf zu Sporenketten reifen, die wiederum zu einzelnen Sporen zerfallen. In $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind bis Zeitpunkt 18 Stunden nur vegetative Hyphen erkennbar, welche nach 18 Stunden fragmentieren. Nach 36 Stunden sind in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ neben septierenden Hyphen auch Sporen zu erkennen. Mikroskopische Aufnahmen von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kultiviert in MYM-Medium. Phasenkontrast Mikroskopieaufnahmen (100x Vergrößerung) im Zeitverlauf von 12-36 Stunden nach Kultivierungsstart. Zellkulturen wurde mit 1×10^6 CFU /ml gestartet.

Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, weisen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ im Vergleich zum WT auch in MYM-Flüssigkultur eine deutlich verzögerte Entwicklung auf. Die mikroskopischen Aufnahmen von *S. venezuelae* WT zeigen bis zum Zeitpunkt 14 Stunden ausschließlich vegetative Hyphen, welche ab Zeitpunkt 16 Stunden zu fragmentieren beginnen. Zum Zeitpunkt 18 Stunden sind in *S. venezuelae* WT neben fragmentierten Hyphen auch Sporen zu erkennen, welche zu Zeitpunkt 20 Stunden und 36 Stunden die gesamte Zellmasse ausmachen. $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ weisen bis Zeitpunkt 18 Stunden ausschließlich vegetatives Wachstum auf. Zu Zeitpunkt 20 Stunden beginnen die Hyphen zu fragmentieren und nach 36 Stunden sind Sporen zu erkennen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Deletion von *rmdA* und *rmdB* auch in Flüssigkultur zu einer signifikant verzögerten Entwicklung führt. Anders als auf MYM-Festmedium kultiviert (s. 2.2.1.1) ist zwischen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kein Unterschied hinsichtlich der Entwicklungsgeschwindigkeit erkennbar und beide Stämme durchlaufen verzögert alle für *S. venezuelae* charakteristischen Entwicklungsschritte.

2.2.1.3 *ftsZ-ypet* wird in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* deutlich später als *S. venezuelae* WT+ *ftsZ-ypet* exprimiert und nur im WT+ *ftsZ-ypet* und in $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* ist ein charakteristisches Lokalisierungsmuster zu erkennen

Das Gen *ftsZ* wird zum Zeitpunkt der Septierung verstärkt exprimiert (Flardh et al. 2000). Dabei polymerisiert FtsZ an den Septierungsstellen zu kontraktilen Ringen, welche während der Septierung ein leiterartiges Muster innerhalb der Hyphen bilden (Haeusser and Margolin 2016). Entsprechend eignet sich FtsZ als Marker für die Transition von Lufthyphenausbildung und Sporulation. In diesem Experiment wurde pSS05 (s. Tabelle 3), welches *ftsZ-ypet* enthält, in *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ konjugiert und in die integrative Phagenstelle *attB* _{ϕ_{BT1}} des Chromosoms integriert (s. 4.5.14) (Schlimpert et al. 2017). Nach Expression wird eine Fusion von FtsZ und dem gelbfluoreszierenden Protein YPet generiert. Das auf pSS05 vorliegende Gen *ftsZ* enthält seine native Promotorsequenz. Die Stämme $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* wurden in MYM-Flüssigmedium kultiviert (s. 4.3.1 und 4.4.4). Mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. 4.8.1) wurden Aufnahmen über den Zeitraum 12-20 Stunden erstellt. Als Kontrollen wurde *S. venezuelae* WT und WT+ *ftsZ-ypet* mitgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 aufgeführt.

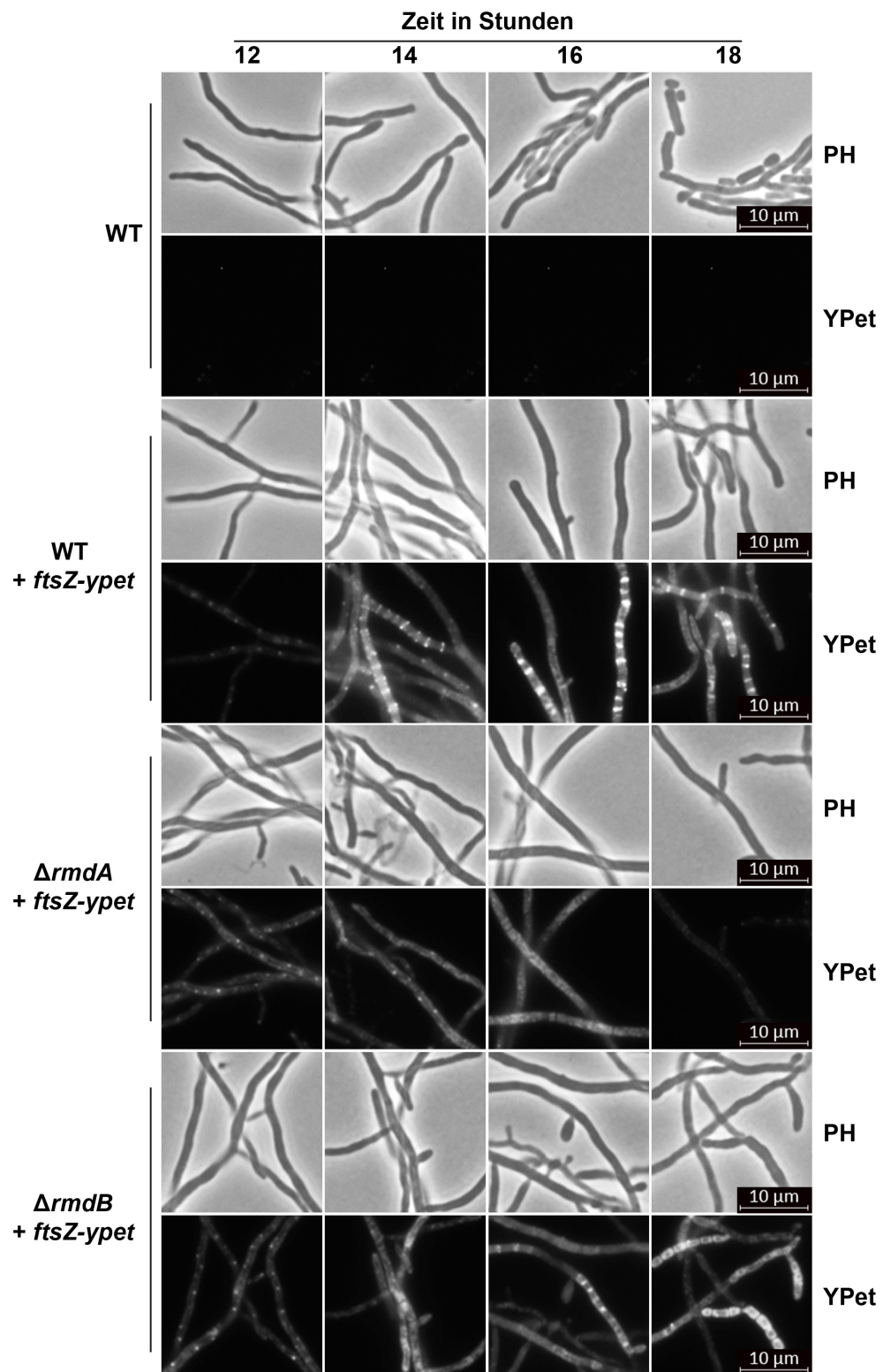


Abbildung 8: *ftsZ-ypet* wird in $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* deutlich später als im WT exprimiert und nur im WT+ *ftsZ-ypet* und in $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* ist ein charakteristisches Lokalisierungsmuster zu erkennen. *S. venezuelae* WT+ *ftsZ-ypet* zeigt nach 14 Stunden eine verstärkte Expression von *ftsZ-ypet* und ein leiterartiges Lokalisierungsmuster von FtsZ-YPet. In $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* ist über den gesamten Zeitraum nur ein diffuses Fluoreszenzsignal zu erkennen, ohne dass eine spezifische Lokalisierung detektierbar wäre. In $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* ist ab 14 Stunden ein verstärktes Fluoreszenzsignal und ab 16 Stunden ein leiterartiges Lokalisierungsmuster von FtsZ-YPet zu erkennen. In *S. venezuelae* WT ist kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. venezuelae* WT, WT+ *ftsZ-ypet*, $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* kultiviert in MYM-Medium über einen Zeitraum von 12-18 Stunden. Seitliche Beschriftung: YPet= Fluoreszenzmikroskopie, PH= Phasenkontrast.

Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, wird *ftsZ-ypet* in $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* im Vergleich zum WT+ *ftsZ-ypet* deutlich später exprimiert und nur in WT+ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* ist ein leiterartiges Lokalisierungsmuster zu erkennen. In *S. venezuelae* WT+ *ftsZ-ypet* wird *ftsZ-ypet* bereits zum Zeitpunkt 14 Stunden stark exprimiert und es ist eine leiterartige Lokalisierung von FtsZ-YPet innerhalb der Hyphen zu erkennen. Dieses Lokalisierungsmuster von FtsZ-YPet ist in *S. venezuelae* WT+ *ftsZ-ypet* bis Zeitpunkt 18 Stunden zu erkennen. Der Vergleich der Phasenkontrastaufnahmen von WT und WT+ *ftsZ-ypet* zeigt eine deutliche Verzögerung der Entwicklung in WT+ *ftsZ-ypet*. In $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* ist ab Zeitpunkt 14 Stunden eine erhöhte Expression von *ftsZ-ypet* zu erkennen, welche sich durch ein verstärktes Fluoreszenzsignal äußert. Weiterhin ist ab Zeitpunkt 16 Stunden in $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* auch eine spezifische Lokalisierung von FtsZ-YPet zu erkennen, welches wie in WT+ *ftsZ-ypet* ein leiterartiges Muster innerhalb der Hyphen bildet. In $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* ist über den gesamten Zeitraum nur ein diffuses Fluoreszenzsignal erkennbar, welches zu Zeitpunkt 18 Stunden kaum mehr detektierbar ist. Weiterhin ist in $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* keine spezifische Lokalisierung von FtsZ-YPet zu erkennen. Der als Kontrolle mitgeführte WT zeigt kein Fluoreszenzsignal.

Um die FtsZ-YPet Konzentration in den verschiedenen Stämmen spezifisch vergleichen zu können, wurden Immunoblot Analysen durchgeführt. Dazu wurden identische Proteinmengen (s. 4.7.10) aus *S. venezuelae* WT, WT+ *ftsZ-ypet*, $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* mittels SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennt, per Western Blot (s. 4.7.16) auf PVDF-Membran übertragen und eine Immunodetektion von FtsZ-YPet mittels spezifischer anti-GFP Antikörper durchgeführt (s. 4.7.16 und Tabelle 11). Als Kontrolle wurde Zellmaterial von *S. venezuelae* WT mitgeführt. Die Bandenintensitäten von FtsZ-YPet wurden ermittelt und prozentual mit denen aus WT+ *ftsZ-ypet* verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 und die dazugehörige Ladekontrollen in Abbildung 34 aufgeführt.

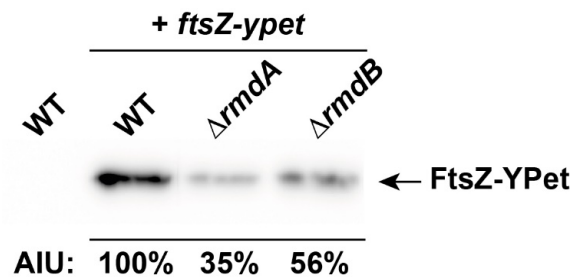


Abbildung 9: Das Gen *ftsZ-ypet* wird zu Zeitpunkt 12 Stunden in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* deutlich geringer exprimiert als in WT+ *ftsZ-ypet*. Immunodetektion von FtsZ-YPet mittels spezifischer anti-GFP Antikörper zur Untersuchung der Konzentration von FtsZ-YPet in den Stämmen *S. venezuelae* WT, WT+ *ftsZ-ypet*, $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet*. Die Stämme wurden für 12 Stunden in MYM-Medium kultiviert und anschließend 14 μ g Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf PVDF-Membran übertragen. Die Bandenintensität in den Proben aus $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* wurde mit der Bandenintensität in der Probe von WT+ *ftsZ-ypet* verglichen und der prozentuale Unterschied der Intensitäten ermittelt. Zur Quantifizierung wurden *Arbitrary Units* (AIU) berechnet. Dieses Experiment wurde von Sara Neumann durchgeführt.

Wie aus dem Vergleich der prozentualen Konzentration von FtsZ-YPet in den Stämmen *S. venezuelae* WT, WT+ *ftsZ-ypet*, $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* in Abbildung 9 hervorgeht, ist diese in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* stark verringert. Im Vergleich zu WT+ *ftsZ-ypet* ist in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* zum Zeitpunkt 12 Stunden 65% weniger FtsZ-YPet detektierbar. In $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* ist die Konzentration an FtsZ-YPet im Vergleich zu WT+ *ftsZ-ypet* um 44 % verringert. In Zelllysat aus *S. venezuelae* WT, welches als Kontrolle mitgeführt wurde, ist kein FtsZ-YPet detektierbar.

Aus den Ergebnissen dieser Experimenten kann abgeleitet werden, dass die Expression von *ftsZ-ypet* in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* später als in WT+ *ftsZ-ypet* erfolgt und zu Zeitpunkt 12 Stunden deutlich geringer ausfällt als in WT+ *ftsZ-ypet*. Weiterhin ist nur in WT+ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* ein leiterartiges Lokalisierungsmuster von FtsZ-YPet zu erkennen. Das in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* kein spezifisches Lokalisierungsmuster zu erkennen ist, ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass FtsZ in diesem Stamm nicht die nötige Konzentration erreicht um zu polymerisieren. Wie der Vergleich von WT und WT+ *ftsZ-ypet* zeigt, verlangsamt die Expression von *ftsZ-ypet* die Differenzierungsgeschwindigkeit.

2.2.1.4 $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zeigen hinsichtlich der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp einen identischen Wachstumsverlauf

Um den Wachstumsverlauf von *S. venezuelae* $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ mit dem WT vergleichen zu können, wurde die Zunahme der optischen Dichte während des Wachstums bei OD₅₇₈ ermittelt (s. 4.4.7). Dazu wurden *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ in MYM-Flüssigmedium kultiviert (s. 4.3.1 und 4.4.4) und im Zeitraum 8-18 Stunden stündlich eine Zellkulturprobe entnommen und die optische Dichte ermittelt (s. 4.4.7). Das Ergebnis ist in Abbildung 10 aufgeführt.

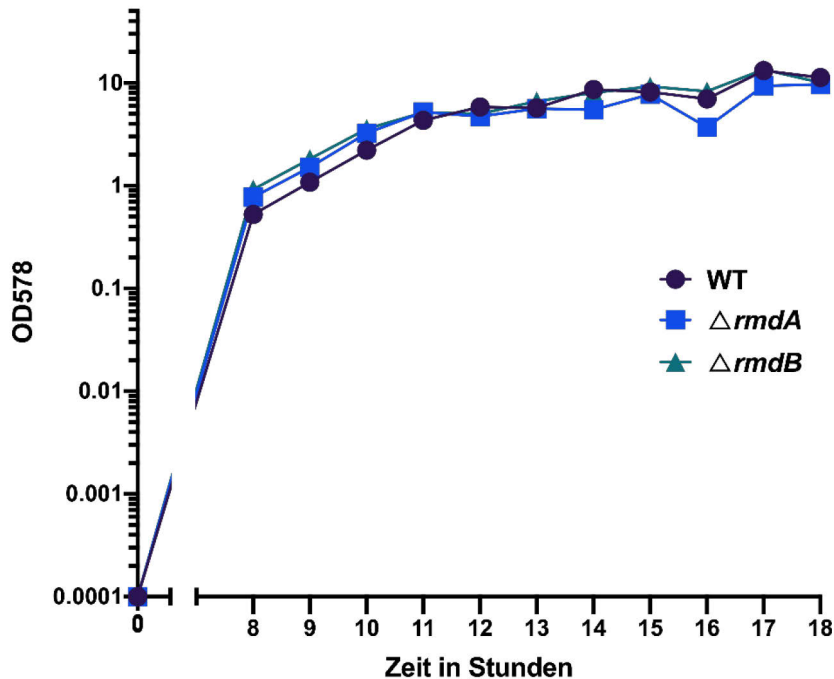


Abbildung 10: $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zeigen hinsichtlich der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp einen identischen Wachstumsverlauf. Zellkulturproben wurden im Zeitraum 8-18 Stunden stündlich entnommen und bei OD₅₇₈ gemessen.

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, zeigen die Deletionsstämme $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ hinsichtlich der Zunahme der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp einen identischen Wachstumsverlauf. In allen untersuchten Stämmen endet die exponentielle Wachstumsphase nach ca. 11 Stunden.

Aus den Ergebnissen dieses Experiments kann geschlossen werden, dass die Deletion von *rmdA* und *rmdB* den Wachstumsverlauf hinsichtlich der Zunahme der Zellmasse nicht beeinflusst.

2.2.2 Generierung von chromosomalen Mutationen in *rmdA* und *rmdB* sowie Komplementationsexperimente

In 2.2.1.1 und 2.2.1.2 konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rmdA* und *rmdB* die Entwicklung von *S. venezuelae* signifikant verlangsamt und die Stämme $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ einen morphologischen Phänotyp aufweisen. Nun sollte mittels chromosomaler Mutationen untersucht werden, welche Enzymaktivität vermittelnden Sequenzmotive für die *in vivo* Funktion von RmdA und RmdB essenziell sind.

2.2.2.1 Das EAL-Motiv ist für die Funktion von RmdA und RmdB essenziell

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die Funktion von RmdA und RmdB durch das GGDEF bzw. EAL-Motiv vermittelt wird (s. 1.4.2.). Dazu wurden die für das GGDEF-Motiv von RmdA und das EAL-Motiv von RmdA und RmdB kodierenden chromosomalen Sequenzen in *S. venezuelae* so mutiert, dass diese nicht mehr enzymatisch funktional waren. Das EAL-Motiv wurde zu AAA und das GGDEF-Motiv zu ALLEF verändert (s. 4.5.13, Tabelle 2 und Tabelle 3). Da die chromosomale Mutation der für das GGDEF-Motiv von RmdB kodierenden Sequenz nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde in diesem Fall eine Variante von *rmdB* mit GGAAF kodierender Sequenz in die integrative Phagenstelle attB_{ΦBT1} des Chromosoms von $\Delta rmdB$ integriert (s. 4.5.14). Zum Vergleich der Entwicklungsphänotypen wurden Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$, *rmdA*^{AAA}, *rmdA*^{ALLEF}, $\Delta rmdB$, *rmdB*^{AAA}, $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG sowie $\Delta rmdB::rmdB$ ^{GGAAF}-FLAG auf MYM-Agar (s. 4.3.2 und 4.8.2) kultiviert. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 aufgeführt.



Abbildung 11: Die Mutation der jeweiligen kodierenden Sequenz für das EAL-Motiv von RmdA und RmdB führt zu denselben Entwicklungsphänotypen wie die Deletion der jeweiligen kodierenden Gene. Die chromosomale Mutation der kodierenden Sequenz für das GGDEF-Motiv von RmdA oder das Einfügen einer in der GGDEF-Motiv kodierenden Sequenz mutierten Version von *rmdB* in $\Delta rmdB$ hat keinen verzögernden Einfluss auf die Entwicklung. Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$, $\Delta rmdB$, $rmdA^{AAA}$, $rmdA^{ALLEF}$, $rmdB^{AAA}$, $\Delta rmdB::rmdB\text{-FLAG}$ und $\Delta rmdB::rmdB^{GGAAF}\text{-FLAG}$ kultiviert auf MYM-Agar über einen Zeitraum von 4 Tagen. Alle Makrokolonien wurden durch das Tropfen von $12\mu\text{l } 2 \times 10^5 \text{ CFU}/\mu\text{l}$ auf MYM-Agar kultiviert.

Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, führt die chromosomale Mutation der für das EAL-Motiv kodierenden Sequenz in *S. venezuelae* *rmdA*^{AAA} und *rmdB*^{AAA} zu sehr ähnlichen Phänotypen wie bei $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$. Die Entwicklung von *S. venezuelae* *rmdA*^{AAA} und *rmdB*^{AAA} ist im Vergleich zum WT deutlich verzögert. Während *S. venezuelae* WT bereits nach zwei Tagen mit der Ausbildung von Sporen beginnt, weisen *rmdA*^{AAA} und *rmdB*^{AAA} wie $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zu diesem Zeitpunkt erste Anzeichen einer Ausbildung von Lufthyphen auf. Nach vier Tagen hat *rmdA*^{AAA} wie $\Delta rmdA$ bereits sporuliert und *rmdB*^{AAA} weist wie $\Delta rmdB$ neben weißen Lufthyphen auch grün gefärbte Sporen auf. Die chromosomale Mutation der für das GGDEF-Motiv kodierenden Sequenz in *S. venezuelae* *rmdA*^{ALLEF} hat keinen Effekt auf die Entwicklung. *RmdA*^{ALLEF} entwickelt sich genauso schnell wie der WT und zeigt dabei alle charakteristischen morphologischen Entwicklungsschritte. Dasselbe gilt für den Stamm $\Delta rmdB::rmdB^{GGAFF}$, in welchem eine Version von RmdB mit degeneriertem GGDEF-Motiv exprimiert wurde. Die Expression von p3xFLAG*rmdB*^{GGAFF}-FLAG komplementiert den Phänotyp von $\Delta rmdB$ vollständig und $\Delta rmdB::rmdB^{GGAFF}$ -FLAG entwickelt sich wie der als Kontrolle mitgeführte Stamm $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG beinahe identisch zum WT.

Die Mutation der kodierenden Sequenzen für das EAL-Motiv RmdA und RmdB führt zu einem morphologischen Phänotyp, welcher mit dem Phänotyp der Nullmutanten $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ vergleichbar ist. Die Mutagenese des GGDEF-Motivs von RmdA und RmdB hat hingegen keinen Einfluss auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der jeweiligen Stämme.

2.2.3 Analyse der Expressionsmuster von *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG und Lokalisation von RmdA-FLAG, RmdB-FLAG, RmdA-mCherry sowie RmdB-mCherry innerhalb der Hyphen

Mittels Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern sowie Proteinfusionen mit dem rot fluoreszierenden mCherry Protein sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt *rmdA* und *rmdB* exprimiert werden und wo RmdA-FLAG und RmdB-FLAG lokalisiert werden.

2.2.3.1 *rmdB*-FLAG wird in Flüssigkultur stärker exprimiert als *rmdA*-FLAG, wobei auch die Expressionsmuster variieren

Um die zeitliche Genexpression von *rmdA* und *rmdB* und möglicherweise auftretende posttranslationale Veränderungen der Proteine untersuchen zu können, sollten RmdA und RmdB in Zelllysaten mittels Immunodetektion identifiziert werden. Die Komplementationsstämme $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG (s. Tabelle 2) ermöglichen eine Detektion von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG über den fusionierten FLAG-Affinitätsmarker. Die Stämme wurden in MYM-Flüssigmedium kultiviert (s. 4.3.1 und 4.4.4) und im Zeitraum 8-20 Stunden stündlich Proben entnommen. Die Zellen wurden wie in 4.7.7 beschrieben aufgeschlossen, die Proteinkonzentration bestimmt (s. 4.7.10) und einheitliche

Proteinmengen per SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden per Western Blot auf PVDF-Membran übertragen (s. 4.7.16) und anschließend mittels spezifischer Anti-FLAG-Antikörper detektiert (s. 4.7.16). Als Kontrolle wurde *S. venezuelae* WT Zelllysate mitgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 und die dazugehörigen Ladenkontrollen in Abbildung 35 aufgeführt.



Abbildung 12: *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG werden im Zeitraum 8-20 Stunden nach Start der Kultivierung exprimiert. Immunodetektion von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG mittels Anti-FLAG Antikörper nach erfolgtem Western Blot auf PVDF-Membran. *rmdA*-FLAG wird über den untersuchten Zeitraum konstant exprimiert. Bei den Proben aus $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG ist eine Zunahme des Signals von RmdB-FLAG bis 14 Stunden und anschließend eine konstante Expression auf gleich hohem Niveau zu erkennen. Für die Detektion von RmdA-FLAG wurde je Zeitpunkt 15 μ g Gesamtprotein und für RmdB-FLAG 10 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Als Kontrolle wurde WT-Zelllysate mitgeführt (WT).

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, werden *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert. *rmdA*-FLAG wird über den untersuchten Zeitraum konstant exprimiert, wobei 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen werden mussten, um ein deutliches Signal zu erhalten. *rmdB*-FLAG wird stärker als *rmdA*-FLAG exprimiert und es mussten nur 10 μ g Gesamtprotein aufgetragen werden, um ein starkes Signal zu erhalten. Weiterhin ist eine Zunahme der Proteinkonzentration von RmdB-FLAG bis Zeitpunkt 14 Stunden zu erkennen, anschließend wird *rmdB*-FLAG konstant und stark ausgeprägt exprimiert. Sowohl in den Proben aus $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG als auch aus $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG sind keine posttranslationalen Modifikationen wie Proteolyse zu beobachten. Das als Negativkontrolle mitgeführte WT Zelllysate zeigt keine Immunodetektion mit Anti-FLAG-Antikörper.

Aus diesen Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG während des gesamten untersuchten Zeitraums exprimiert werden. Dabei sind jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke und dem Expressionsmuster von *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG zu erkennen, wobei *rmdB*-FLAG deutlich stärker exprimiert wird.

2.2.3.2 RmdB-FLAG ist nur in der Membranfraktion und RmdA-FLAG in der zytosolischen und der Membranfraktion detektierbar

Wie in 2.1.1 beschrieben, weist RmdB im Gegensatz zu RmdA sechs Transmembrandomänen auf, welche vermuten lassen, dass RmdB an der Zellmembran lokalisiert wird. Um dies experimentell zu bestätigen, sollte nun mittels der FLAG-Affinitätsmarker und spezifischer Anti-FLAG Antikörper untersucht werden, ob RmdA-FLAG und RmdB-FLAG im Zytosol oder in der Zellmembran lokalisiert sind. Dazu wurde Zellmaterial von $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG nach 18 Stunden Kultivierung in MYM-Medium (s. 4.3.1 und 4.4.4) geerntet, per Hochdruckaufschlussverfahren (s. 4.7.8) aufgeschlossen und das Zelllysate per Ultrazentrifugation in Membranfraktion und zytosolische Fraktion getrennt (s. 4.7.9). Die Membranfraktionen wurden mit 1xPBS gewaschen und zusätzlich mit Na_2CO_3 behandelt, um ggf. verbliebene zytosolische Proteine von dieser zu lösen (s. 4.7.9). Die Proteinkonzentration wurde ermittelt und einheitliche Proteinmengen per SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden per Western Blot auf PVDF-Membran übertragen (s. 4.7.16) und anschließend mittels spezifischer Anti-FLAG-Antikörper detektiert (s. 4.7.16). Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

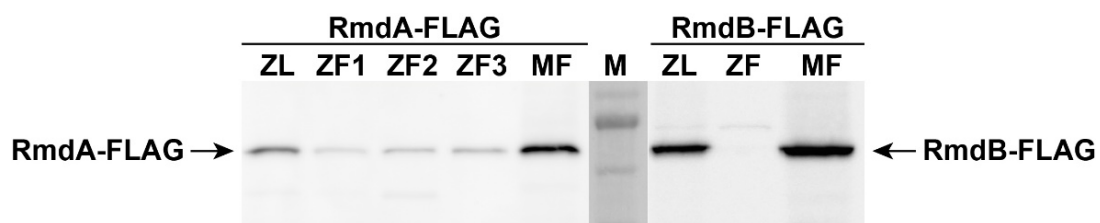


Abbildung 13: RmdA-FLAG ist im Vergleich zu RmdB-FLAG auch in der zytosolischen Fraktion (ZF) detektierbar wohingegen RmdB-FLAG ausschließlich in der Membranfraktion (MF) detektierbar ist. Immunodetektion von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG mittels Anti-FLAG Antikörper nach erfolgtem Western Blot auf PVDF-Membran. Für die Lokalisierung wurden je 20 μg Gesamtprotein eingesetzt. M= Größenmarker, ZL= Zelllysate, ZF= zytosolische Fraktion, MF= Membranfraktion.

Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, sind RmdA-FLAG und RmdB-FLAG in unterschiedlichen Zellbereichen lokalisiert. RmdA-FLAG ist sowohl in der zytosolischen Fraktion als auch in der Membranfraktion detektierbar. Die Waschschritte und die Behandlung mit Na_2CO_3 und führen zu einer teilweisen Extraktion aus der Membranfraktion. RmdB-FLAG ist hingegen ausschließlich in der Membranfraktion detektierbar.

Aus den Ergebnissen dieses Experiments kann geschlossen werden, dass RmdB-FLAG wie vermutet in der Membran lokalisiert ist, während RmdA-FLAG sowohl in der Membranfraktion als auch in der zytosolischen Fraktion detektiert werden kann. Dies ist dahingegen unerwartet, da RmdA keine Transmembrandomänen aufweist. Möglicherweise präzipitiert RmdA-FLAG beim Aufschluss oder es interagiert stark mit einem Membranprotein.

2.2.3.3 RmdB-mCherry zeigt mit fortschreitender Entwicklung innerhalb der vegetativen Hyphen ein spezifisches Lokalisierungsmuster

In diesem Experiment sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, ob RmdA und RmdB innerhalb der Hyphen spezifisch lokalisiert werden. Dafür wurden die Gene *rmdA* und *rmdB* in das Plasmid pSS172 (s. Tabelle 7) kloniert, welches nach Expression eine C-terminale Fusion mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry vermittelt. Die Gene *rmdA* und *rmdB* wurden mitsamt des jeweiligen nativen Promotors kloniert, um das natürliche Expressionsverhalten zu untersuchen. Nach erfolgter Konjugation (s. 4.5.14) von pSS172-*rmdA* und pSS172-*rmdB* in *S. venezuelae* $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ wurden diese Stämme in MYM-Medium kultiviert (s. 4.3.1 und 4.4.4) und im Zeitraum 14-18 Stunden Proben für die Fluoreszenzmikroskopie (s. 4.8.1) entnommen. *S. venezuelae* WT wurde als Kontrolle mitgeführt. Das Signal von mCherry wurde monochromatisch dargestellt, da dies den Kontrast des rot fluoreszierenden Markers verstärkt. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 aufgeführt.

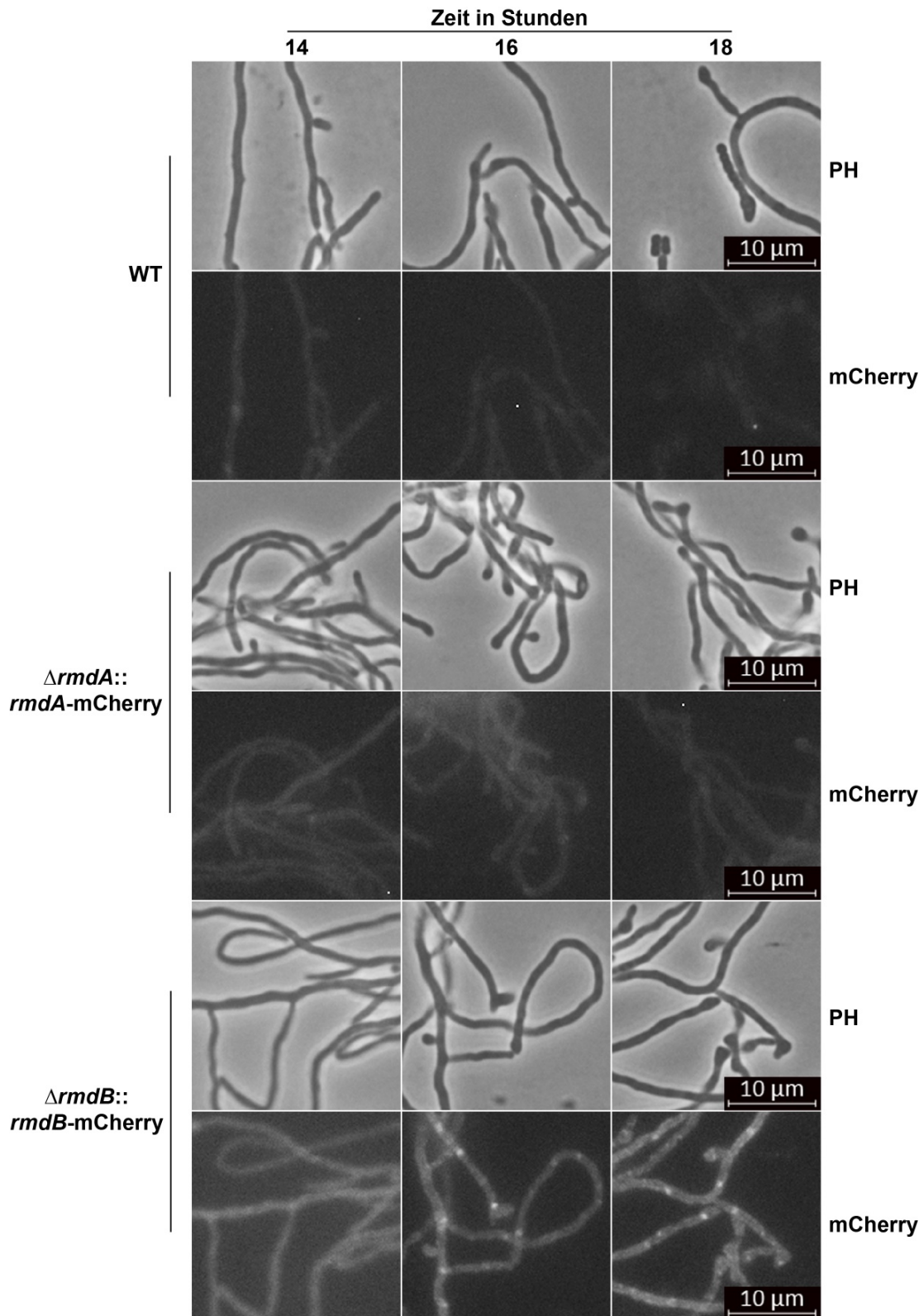


Abbildung 14: *rmdB-mCherry* wird stärker exprimiert als *rmdA-mCherry* und nur in $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ ist ein spezifisches Lokalisierungsmuster von RmdB-mCherry zu erkennen. In $\Delta rmdA::rmdA-mCherry$ ist nur ein schwaches und diffuses Fluoreszenzsignal detektierbar, welches nicht spezifisch lokalisierbar ist. *S. venezuelae* WT zeigt ein schwaches diffuses Hintergrundsignal. Fluoreszenzmikroskopie mit *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA::rmdA-mCherry$ und $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ kultiviert in MYM-Medium über einen Zeitraum von 14-18 Stunden. Die Fluoreszenzbilder wurden monochromatisch dargestellt, um die Detektion zu verbessern. Seitliche Beschriftung: mCherry= Fluoreszenzmikroskopie, PH= Phasenkontrast.

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, werden *rmdA-mCherry* und *rmdB-mCherry* unterschiedlich stark exprimiert und nur in $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ ist ein Lokalisierungsmuster von RmdB-mCherry zu erkennen. In $\Delta rmdA::rmdA-mCherry$ ist über den gesamten Zeitraum ein schwaches und diffuses Fluoreszenzsignal, aber keine spezifische Lokalisierung detektierbar. In $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ ist ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal detektierbar, welches zum Zeitpunkt 14 Stunden noch diffus in den vegetativen Hyphen verteilt ist. Im Zeitraum 16 und 18 Stunden verstärkt sich das Fluoreszenzsignal in $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ und innerhalb der vegetativen Hyphen sind in regelmäßigen Abständen Akkumulationen des Fluoreszenzsignals zu erkennen. In *S. venezuelae* WT ist durchgängig ein sehr schwaches und diffuses Hintergrundsignal detektierbar.

Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass *rmdB-mCherry* im untersuchten Zeitraum stärker exprimiert wird als *rmdA-mCherry*. Dies unterstreicht die Erkenntnis aus der Analyse der Expressionsmuster von *rmdA-FLAG* und *rmdB-FLAG* in 2.2.3.1, wobei *rmdB-FLAG* deutlich stärker exprimiert wird als *rmdA-FLAG*. Weiterhin konnte zu den späteren Zeitpunkten eine spezifische Lokalisierung des Fluoreszenzsignals innerhalb der vegetativen Hyphen von $\Delta rmdB::rmdB-mCherry$ festgestellt werden.

2.3 *In vitro* Experimente zur Charakterisierung der enzymatischen Funktion von RmdA und RmdB und zur möglichen Regulation von *rmdA* und *rmdB* durch BldD

Wie in 2.1.1 beschrieben, weisen RmdA und RmdB jeweils sowohl eine intakte GGDEF- als auch EAL-Domäne auf und sind damit theoretisch in der Lage c-di-GMP sowohl zu produzieren als auch zu degradieren (s. 1.3.1 und 1.4.2). Mittels gereinigter Proteinvarianten von RmdA und RmdB sollte die enzymatische Aktivität untersucht werden. Weiterhin sollte eine mögliche transkriptionelle Regulation von *rmdA* und *rmdB* durch BldD untersucht werden (s. 1.2.1).

RmdA und RmdB für *in vitro* Experimente wurde transgen in *E. coli* produziert. Die Gene wurden in die Expressionsvektoren pET15b und pMAL-c2 kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert (s. Tabelle 2 und Tabelle 3 sowie 4.5.11). Der Expressionsvektor pET15b vermittelt nach Expression einen N-terminalen 6xHis-Affinitätsmarker und pMAL-c2 einen N-terminalen Maltose-Bindungsprotein-Affinitätsmarker (MbP) (s. 4.7.3 und 4.7.4). Für eine erfolgreiche Aufreinigung von RmdA musste der N-terminale Bereich bis zur PAS-Domäne grundsätzlich entfernt werden, da das Protein ansonsten nicht gereinigt werden konnte und ausschließlich in der Membranfraktion lokalisiert war. Auch RmdB wurde aus Gründen einer besseren Löslichkeit stets ohne die sechs N-terminalen Transmembrandomänen generiert. Von RmdA wurde neben einer nativen Variante (RmdA) auch eine Version mit mutiertem GGDEF-Motiv (RmdA^{GGAAF}) generiert. Von RmdB wurden neben der nativen Variante (RmdB)

zwei weitere Varianten generiert, wobei RmdB^{GGDEF} nur die GG(D/E)F-Domäne und RmdB^{EAL} nur die EAL-Domäne enthält. In Abbildung 15 sind die Varianten von RmdA und RmdB grafisch aufgeführt, welche für *in vitro* Experimente verwendet wurden.

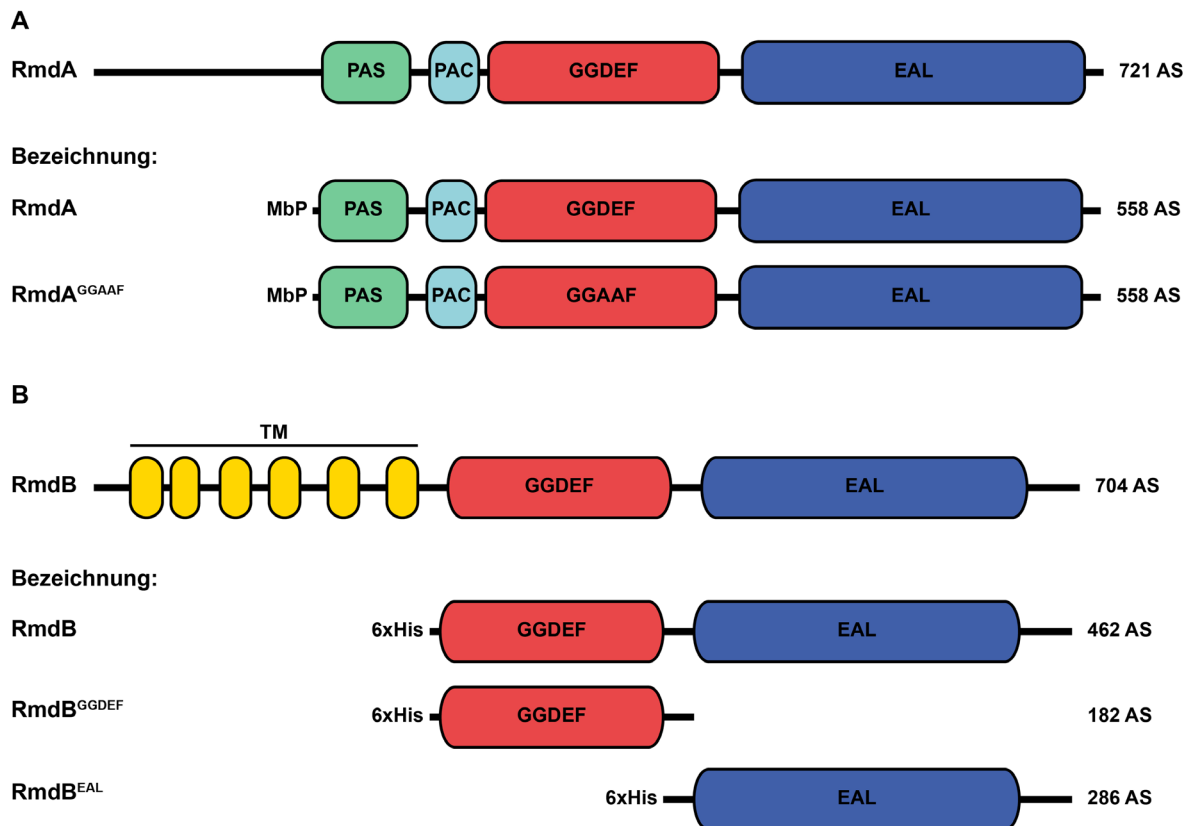


Abbildung 15: Grafische Übersicht der generierten Versionen von RmdA und RmdB, welche für *in vitro* Experimente eingesetzt wurden. Die kodierende Gensequenz *rmdA* wurde in das Expressionsplasmid pMAL-c2 kloniert, wobei RmdA nach Expression N-terminal mit einem Maltose-Binding-Protein (MbP) als Affinitätsmarker fusioniert wird. Die für den N-terminalen Bereich von RmdA kodierende Sequenz musste aus Löslichkeitsgründen entfernt werden. Die Mutation des GGDEF-Motivs von RmdA erfolgte durch Mutation der kodierenden Sequenz mittels PCR (s. 4.5.4) oder ortsspezifischer-Mutagenese (s. 4.5.64.5.4) und spezifischen Oligonukleotiden (s. Tabelle 7). Die kodierende Gensequenz *rmdB* wurde in das Expressionsplasmid pET15b kloniert, wobei RmdB nach der Expression N-terminal mit einem 6xHistidin (His) als Affinitätsmarker fusioniert wird. Die für die Transmembrandomänen (TM) kodierende Sequenz von RmdB musste aus Löslichkeitsgründen entfernt werden.

Nach Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wurden die Zellen per Hochdruckaufschlussverfahren homogenisiert (s. 4.7.2) und die Proteine mittels Ni-NTA- bzw. Amylose-Affinitätschromatografie (s. 4.7.3 und 4.7.4) isoliert.

2.3.1 RmdA und RmdB weisen *in vitro* Phosphodiesterase- und RmdA auch Diguanylatzyklaseaktivität auf

RmdA aus *S. coelicolor* und RmdB aus *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* wurden bereits als Phosphodiesterasen charakterisiert (Hull et al. 2012; Makitrynsky et al. 2020). Um die Enzymaktivität von RmdA und RmdB aus *S. venezuelae* untersuchen zu können, wurden die wie in 4.7.1 beschrieben generierten Varianten von RmdA und RmdB in Dialysepuffer dialysiert (s. 4.7.6), die Proteinkonzentration bestimmt (s. 4.7.11) und die Proteine in einer Konzentration von 1 μ M in einem Phosphodiesterase (PDE)- bzw. Diguanylatzyklase (DGC)-Assay eingesetzt (s. 4.7.17). Die Experimente wurden als Doppelansätze durchgeführt wobei in beiden Ansätzen [32 P]c-di-GMP oder [32 P]GTP als Substrat eingesetzt wurde.

Jeweils ein Ansatz wurde zusätzlich mit 1 mM unmarkiertem GTP bzw. c-di-GMP supplementiert. Hiermit sollte untersucht werden, ob die Bindung von GTP an die GG(D/E)EF-Domäne einen Einfluss auf die potenzielle PDE-Aktivität der EAL-Domäne hat und ob sich c-di-GMP über die I-Site inhibierend auf eine mögliche DGC-Aktivität auswirkt. In einem weiteren DGC-Assay wurde neben RmdA auch die Variante RmdA^{GGAAF} eingesetzt, in welcher die GGDEF Domäne zu GGAAF mutiert wurde. Als Kontrollen wurde die Phosphodiesterase PdeH aus *E. coli* bzw. die Diguanylatzyklase PleD* aus *C. crescentus* mitgeführt (Paul et al. 2007; Pesavento et al. 2008). Die Ergebnisse der PDE und DGC-Assays sind in Abbildung 16A und B aufgeführt.

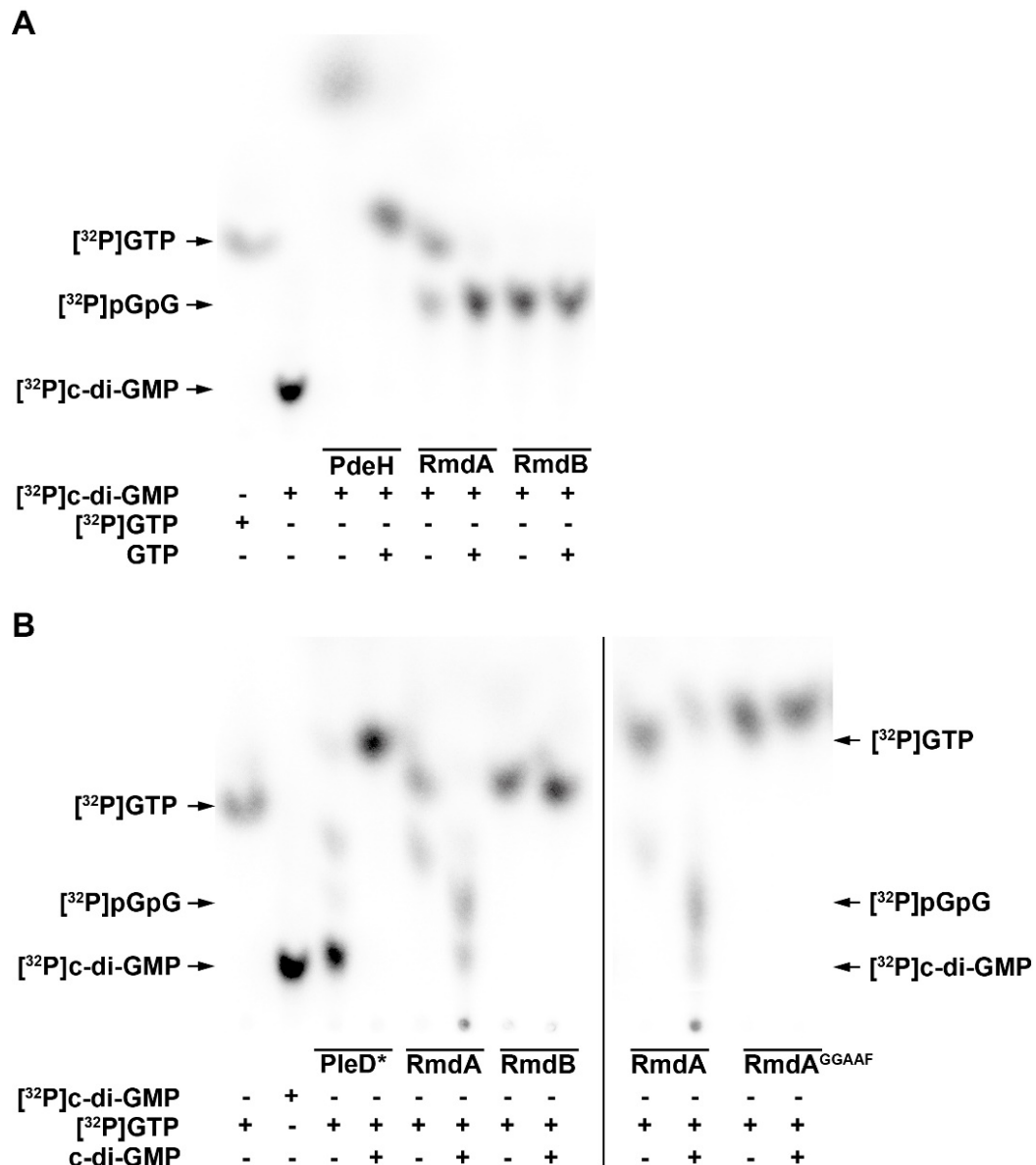


Abbildung 16: RmdA und RmdB weisen *in vitro* Phosphodiesteraseaktivität und RmdA zusätzlich Diguanylatzyklaseaktivität auf. **A:** Phosphodiesterase-Assay mit RmdA, RmdB und PdeH als Positivkontrolle. RmdA und RmdB weisen Phosphodiesteraseaktivität auf und hydrolysieren [³²P]c-di-GMP zu [³²P]pGpG und RmdA weiter zu [³²P]GMP. Die Zugabe von unmarkiertem GTP hat keinen Einfluss auf die Aktivität von RmdB, führt bei RmdA jedoch dazu, dass [³²P]c-di-GMP nicht mehr weiter zu [³²P]GMP hydrolysiert wird und ausschließlich [³²P]pGpG detektierbar ist. **B:** Diguanylatzyklase-Assay mit RmdA, RmdB und RmdA^{GGAFF} sowie PleD* als Positivkontrolle. In Anwesenheit von unmarkiertem c-di-GMP weist RmdA Diguanylatzyklaseaktivität auf. RmdB weist wie RmdA^{GGAFF} keine Diguanylatzyklaseaktivität auf. Final eingesetzte Konzentrationen: Proteine = 1 µM; [³²P]c-di-GMP = 2,08 nM; [³²P]GTP = 4,16 nM; c-di-GMP = 1 mM; GTP = 1 mM.

Wie aus Abbildung 16A hervorgeht, weisen RmdA und RmdB eindeutig Phosphodiesteraseaktivität auf. RmdB hydrolysiert [³²P]c-di-GMP dabei zu [³²P]pGpG. RmdA hydrolysiert [³²P]c-di-GMP zu [³²P]GMP, wobei [³²P]pGpG als Intermediärprodukt detektierbar ist. Die Zugabe von unmarkiertem GTP hat keinen Einfluss auf die Aktivität von RmdB aber auf die Aktivität von RmdA. In Gegenwart von unmarkiertem GTP hydrolysiert RmdA [³²P]c-di-GMP nicht mehr zu [³²P]GMP und es ist ausschließlich [³²P]pGpG detektierbar. Die

Positivkontrolle PdeH zeigt Phosphodiesteraseaktivität und hydrolysiert [^{32}P]c-di-GMP zu [^{32}P]Pi. Wie auch bei RmdA hat unmarkiertes GTP eine inhibierende Funktion auf die Hydrolyse von [^{32}P]c-di-GMP durch PdeH, wobei diese in Anwesenheit von GTP nur bis [^{32}P]GMP abläuft.

In den durchgeführten DGC-Assays (s. Abbildung 16B) konnte mit RmdB keine Diguanylatzyklaseaktivität detektiert werden. Auch die Zugabe von unmarkiertem c-di-GMP hat keine Auswirkung auf die potenzielle DGC-Funktion von RmdB. Im Ansatz mit RmdA ist zwischen [^{32}P]GTP und [^{32}P]pGpG ein weiteres Signal zu erkennen, welches vermutlich [^{32}P]GMP darstellt. In Anwesenheit von unmarkiertem c-di-GMP weist RmdA eindeutige Diguanylatzyklaseaktivität auf, wobei neben [^{32}P]c-di-GMP auch dessen Abbauprodukt [^{32}P]pGpG identifizierbar ist. In den durchgeführten DGC-Assays mit RmdA^{GGAFF}, welches eine zu GGAFF mutierte GG(D/E)EF-Domäne aufweist, konnte im Vergleich zu RmdA auch in Anwesenheit von unmarkiertem c-di-GMP keine Diguanylatzyklaseaktivität festgestellt werden. Die in allen DGC-Assays mitgeführte Positivkontrolle PleD* weist eindeutige Diguanylatzyklaseaktivität auf, welche in Anwesenheit von unmarkiertem c-di-GMP inaktiviert wird.

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Enzymassays kann geschlussfolgert werden, dass RmdA und RmdB *in vitro* eindeutig Phosphodiesteraseaktivität aufweisen und c-di-GMP hydrolysieren können. Weiterhin weist RmdA auch Diguanylatzyklaseaktivität auf. Die DGC-Aktivität von RmdA ist insbesondere bei Zugabe von unmarkiertem c-di-GMP sichtbar. Vermutlich ist dies darauf zurück zu führen, dass in diesen Experimenten die Phosphodiesteraseaktivität der EAL-Domäne durch den Überschuss an unmarkiertem c-di-GMP gesättigt ist und dadurch Teile des parallel generierten [^{32}P]c-di-GMP detektierbar bleiben. Die Mutation des GGDEF-Motivs von RmdA in GGAFF (RmdA^{GGAFF}) führt zu einem Verlust der DGC-Aktivität.

2.3.2 RmdB bevorzugt Mn^{2+} als Co-Faktor

Wie in 1.3.1 beschrieben, benötigen c-di-GMP metabolisierende Proteine zweiwertige Kationen wie Mn^{2+} oder Mg^{2+} als Co-Faktoren. In diesem Versuch sollte am Beispiel von RmdB und RmdB^{EAL} untersucht werden, ob die Wahl des Co-Faktors Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat. Dazu wurde die Generierung von RmdB und RmdB^{EAL} in strikter Anwesenheit von MnCl_2 oder MgCl_2 durchgeführt (s. 4.7.1) und die Proteine in Dialysepuffer mit MnCl_2 oder MgCl_2 dialysiert (s. 4.7.6). RmdB und RmdB^{EAL} wurden in einem PDE-Assay eingesetzt und der Reaktionspuffer mit MnCl_2 oder MgCl_2 versetzt (s. 4.7.17). In Abbildung 17 ist das Ergebnis der PDE-Assays mit unterschiedlichen zweiwertigen Kationen aufgeführt.

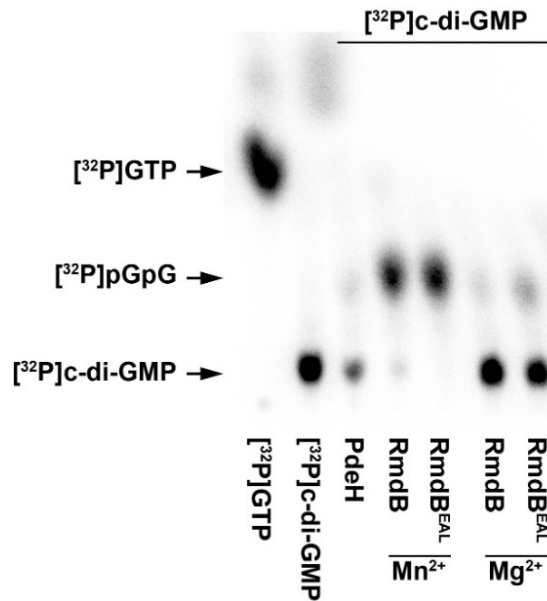


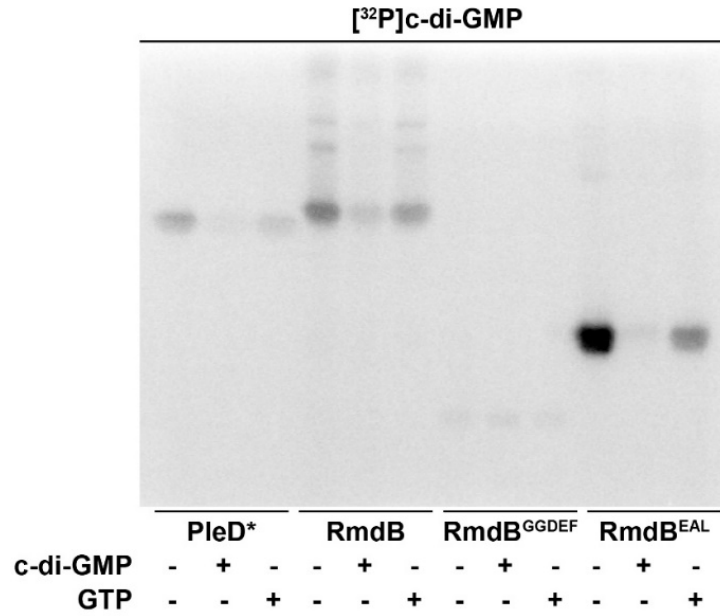
Abbildung 17: RmdB und RmdB^{EAL} weisen mit Mn²⁺ als Co-Faktor eine höhere Aktivität auf als mit Mg²⁺. Phosphodiesteraseassay mit RmdB, RmdB^{EAL} sowie PdeH und [³²P]c-di-GMP als Substrat. RmdB und RmdB^{EAL} weisen, gereinigt in Anwesenheit von Mn²⁺, eine deutlich höhere Aktivität auf, als wenn sie in Anwesenheit von Mg²⁺ gereinigt wurden. Final eingesetzte Konzentrationen: Proteine = 1 µM; [³²P]c-di-GMP = 2,08 nM; [³²P]GTP = 4,16 nM.

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, weisen RmdB und RmdB^{EAL} mit Mn²⁺ als Co-Faktor eine deutlich stärkere Phosphodiesteraseaktivität auf als mit Mg²⁺ als Co-Faktor. In Anwesenheit von Mn²⁺ wird das eingesetzte [³²P]c-di-GMP vollständig umgesetzt, wohingegen in Anwesenheit von Mg²⁺ das eingesetzte [³²P]c-di-GMP nur ansatzweise hydrolysiert wird. Die mitgeführte Kontrolle PdeH wurde in Gegenwart von Mn²⁺ eingesetzt und zeigt eindeutige PDE-Aktivität, wobei [³²P]c-di-GMP zu [³²P]Pi hydrolysiert wird.

2.3.3 RmdB bindet sowohl [³²P]c-di-GMP als auch [³²P]GTP

In 2.3.1 konnte gezeigt werden, dass RmdB trotz der vorhandenen und intakten GGDEF-Domäne keine DGC-Aktivität aufweist. Mittels UV-Crosslink-Experimenten (s. 4.7.18) zwischen RmdB, RmdB^{GGDEF} sowie RmdB^{EAL} und [³²P]c-di-GMP bzw. [³²P]GTP sollte nun die Bindungsspezifität untersucht werden. Außerdem sollte eine mögliche Bindung mittels Kompetition durch die gleichzeitige Zugabe von unmarkiertem c-di-GMP bzw. GTP verifiziert werden. Die Diguanylatzyklase PleD* aus *C. crescentus* wurde als Positivkontrolle mitgeführt, da sie neben GTP über eine intakte I-Site auch c-di-GMP binden kann (Christen et al. 2006). In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der UV-Crosslink-Experimente aufgeführt.

A



B

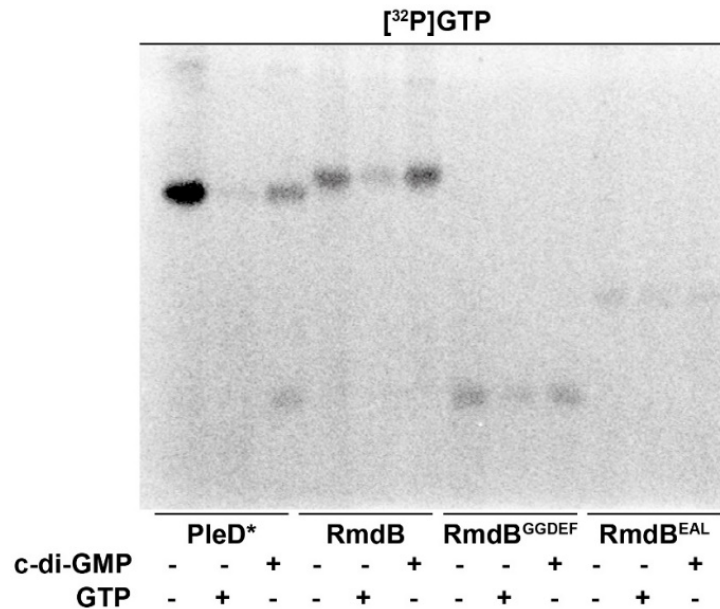


Abbildung 18: RmdB kann sowohl [³²P]c-di-GMP als auch [³²P]GTP binden. UV-Crosslink Experimente zwischen RmdB, RmdB^{GGDEF}, RmdB^{EAL} sowie PleD* und [³²P]c-di-GMP bzw. [³²P]GTP und ggf. Konkurrenz mit unmarkiertem c-di-GMP oder GTP. **A:** UV-Crosslink-Experiment zwischen RmdB, RmdB^{GGDEF}, RmdB^{EAL} sowie PleD* mit [³²P]c-di-GMP und ggf. Konkurrenz mit unmarkiertem c-di-GMP oder GTP. RmdB, RmdB^{EAL} und PleD* zeigen eine spezifische Bindung von [³²P]c-di-GMP, wohingegen RmdB^{GGDEF} keine Bindung von [³²P]c-di-GMP zeigt. Das Polyacrylamidgel wurde 72 Stunden auf einer Röntgenspeicherfolie inkubiert. **B:** UV-Crosslink-Experiment zwischen RmdB, RmdB^{GGDEF}, RmdB^{EAL} sowie PleD* mit [³²P]GTP und ggf. Konkurrenz mit unmarkiertem c-di-GMP oder GTP. RmdB, RmdB^{GGDEF} und PleD* zeigen eine spezifische Bindung von [³²P]GTP, wohingegen RmdB^{EAL} keine Bindung von [³²P]GTP zeigt. Das Polyacrylamidgel wurde 100 Stunden auf einer Röntgenspeicherfolie inkubiert. Final eingesetzte Konzentrationen: Proteine = 4,5 µM; [³²P]c-di-GMP = 42 nM; [³²P]GTP = 83 nM; c-di-GMP = 250 µM; GTP = 500 µM.

Wie aus Abbildung 18A hervorgeht, können RmdB und RmdB^{EAL} [³²P]c-di-GMP spezifisch binden. Konkurrenz mit unmarkiertem c-di-GMP führt zu einer Abschwächung des Signals, wohingegen kaltes GTP kaum Einfluss auf die Signalstärke hat. RmdB^{GGDEF} weist kein Signal

für die Bindung von [32 P]c-di-GMP auf. Die Positivkontrolle PleD* bindet [32 P]c-di-GMP spezifisch, was durch die Konkurrenz mit unmarkiertem c-di-GMP bestätigt wird.

Wie aus Abbildung 18B hervorgeht, können RmdB und RmdB^{GGDEF} [32 P]GTP spezifisch binden, was durch die Konkurrenz mit unmarkiertem GTP bestätigt wird. Die Zugabe von unmarkiertem c-di-GMP hat keinen Einfluss auf die Bindung mit [32 P]GTP. RmdB^{EAL} weist kein Signal für die Bindung von [32 P]GTP auf. Die Positivkontrolle PleD* bindet [32 P]GTP spezifisch. Die Bindung von [32 P]GTP fällt dennoch schwächer aus als die Bindung von [32 P]c-di-GMP, da das SDS-PA-Gel mit 100 Stunden deutlich länger auf der Röntgenspeicherfolie inkubiert werden musste, als bei der Bindung mit [32 P]c-di-GMP, wo bereits nach 75 Stunden Inkubation ein deutliches Signal zu erkennen war.

Aus den Ergebnissen der UV-Crosslink-Experimente kann der Schluss gezogen werden, dass die EAL-Domäne von RmdB wie erwartet in der Lage ist [32 P]c-di-GMP spezifisch zu binden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die GGDEF-Domäne von RmdB [32 P]GTP spezifisch binden kann. Dieses Ergebnis ist dahingehend unerwartet, da RmdB in den durchgeführten DGC-Assays keine DGC-Aktivität aufwies und die Zugabe von GTP keinen Einfluss auf die PDE-Aktivität des Proteins hatte (s. 2.3.1).

2.3.4 BldD bindet nicht an den Promotorregionen von *rmdA* und *rmdB*

Mittels durchgeführter ChIP-Seq-Experimente konnten einige, für c-di-GMP metabolisierende Proteine kodierende Gene wie *cdgA*, *cdgB*, *cdgC* und *cdgE* als direkte BldD-Zielgene identifiziert werden (Tschowri et al. 2014). Für die Gene *rmdA* und *rmdB* konnte hingegen keine Bindung von BldD an deren Promotorregionen festgestellt werden. Um dieses Ergebnis experimentell bestätigen zu können, sollten *Electro-Mobility-Shift*-Assays (EMSA) durchgeführt werden. Hierzu wurden die Promotorsequenzen von *rmdA* (535 bp) und *rmdB* (331 bp) amplifiziert und mit gereinigtem His-BldD in Anwesenheit von ansteigenden c-di-GMP Konzentrationen inkubiert (s. 4.7.19). Das Gen *rmdA* liegt in einem Operon mit dem Gen *vnz_33670*, wobei die Promotorregion stromaufwärts vor Gen *vnz_33670* lokalisiert ist. Das Ergebnis der durchgeführten EMSA-Experimente ist in Abbildung 19 aufgeführt.

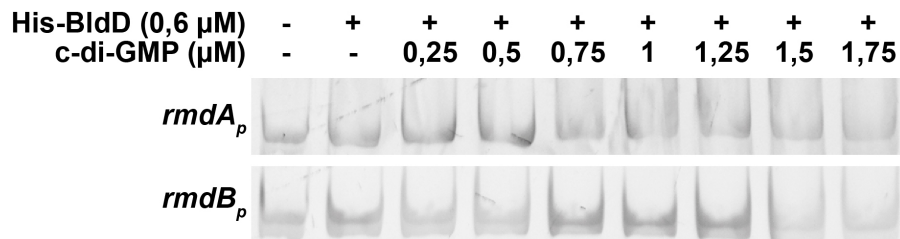


Abbildung 19: His-BldD bindet nicht an den Promotorregionen von *rmdA* und *rmdB*. EMSA-Experimente mit amplifizierter *rmdAp* und *rmdBp* sowie gereinigtem His-BldD in Anwesenheit von c-di-GMP. Pro Experiment wurden 20 ng Oligonukleotid, 0,6 μ M His-BldD, 0,5 μ g poly[d(I-C)] (Roche) und ansteigende c-di-GMP Konzentrationen (0- 1,75 μ M) eingesetzt.

Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, bindet His-BldD weder an der Promotorregion von *rmdA* noch an der Promotorregion von *rmdB*. In beiden Experimenten ist keine Verschiebung der *pDNA*-Bande von *rmdA* und *rmdB* zu erkennen. Auch die Zugabe von c-di-GMP hat keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Aus den Ergebnissen des durchgeführten *Electro-Mobility-Shift-Assay* kann abgeleitet werden, dass His-BldD nicht an den Promotorregionen von *rmdA* und *rmdB* aus *S. venezuelae* binden kann. Damit konnte die Erkenntnis der publizierten Chip-Seq-Experimente bestätigt werden (Tschowri et al. 2014)..

2.4 Globale Analysen zur Charakterisierung von RmdA und RmdB

Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* in *S. venezuelae* bewirkt, wie in 2.1.2 beschrieben, einen ausgeprägten morphologischen Phänotyp, welcher sich durch eine signifikante Verzögerung der Entwicklung äußert. In 2.3.1 konnte gezeigt werden, dass sowohl RmdA als auch RmdB PDE-Aktivität und RmdA auch DGC-Aktivität aufweist. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob und wie sich die c-di-GMP Konzentrationen in *S. venezuelae* WT über die Zeit verändern und ob die Deletionen von *rmdA* und *rmdB* einen Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration haben.

Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern sich die Deletion von *rmdA* und *rmdB* auf das Transkriptom von *S. venezuelae* auswirkt, insbesondere ob die Expression wichtiger entwicklungsspezifischer Regulatoren und Faktoren von der Deletion beeinflusst wird.

2.4.1 RmdA und insbesondere RmdB haben einen Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration in *S. venezuelae*

Um die Konzentration an zellulärem c-di-GMP untersuchen und vergleichen zu können, wurden Nukleotidextraktionen aus *S. venezuelae* WT, Δ *rmdA* und Δ *rmdB* wie in 4.5.17 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde *S. venezuelae* WT, Δ *rmdA* und Δ *rmdB* sowohl in MYM-Medium kultiviert, als auch Makrokolonien auf MYM-Agar angezogen (s. 4.3.1, 4.3.2, 4.4.4 und 4.8.2).

Aus den in MYM-Medium kultivierten Stämmen wurden im Zeitraum 8-20 Stunden Proben für die Nukleotidextraktion und für die Proteinbestimmung entnommen. Wie in den phänotypischen Untersuchungen (s. 2.2.1.2) gezeigt werden konnte, umfasst dieser Zeitraum in *S. venezuelae* WT alle charakteristischen Entwicklungsschritte. Bis Zeitpunkt 14 Stunden konnte dabei in *S. venezuelae* WT ausschließlich vegetatives Wachstum festgestellt werden. Nach 16 Stunden war eine zunehmende Fragmentierung der Hyphen zu beobachten, welche den Übergang zur reproduktiven Wachstumsphase anzeigt. Zu den Zeitpunkten 18-20 Stunden setzt die Sporulation ein und es waren vermehrt einzelne Sporen zu erkennen. Die in Kooperation per LC-MS/MS ermittelten c-di-GMP Konzentrationen wurden auf die Proteinkonzentration normalisiert in *pmol c-di-GMP/mg Protein* gegen die Zeit aufgetragen (s. 4.5.17).

Zellmaterial von Makrokolonien wurde zu den Zeitpunkten 30, 48 und 96 Stunden geerntet, das Nasszellgewicht ermittelt und anschließend die Nukleotidextraktion durchgeführt. Zu den gewählten Zeitpunkten 30 und 48 Stunden sind, wie in 2.2.1.1 beschrieben, die phänotypischen Unterschiede zwischen *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sehr deutlich ausgeprägt. Der WT bildet dabei bereits ein Luftmyzel bzw. zu 48 Stunden bereits Sporen, wohingegen die Deletionsmutanten noch im vegetativen Wachstum verharren. Zum Zeitpunkt 96 Stunden zeigen alle eingesetzten Stämme durch Grünfärbung die Ausbildung von Sporen. Die ermittelten c-di-GMP Konzentrationen wurden auf das Nasszellgewicht normalisiert und in *pmol c-di-GMP/mg Nasszellgewicht* gegen die Zeit aufgetragen (s. 4.5.17).

Die Ergebnisse der Nukleotidextraktion aus *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$, kultiviert in Flüssigkultur und Festmedium ist in Abbildung 20A und B aufgeführt.

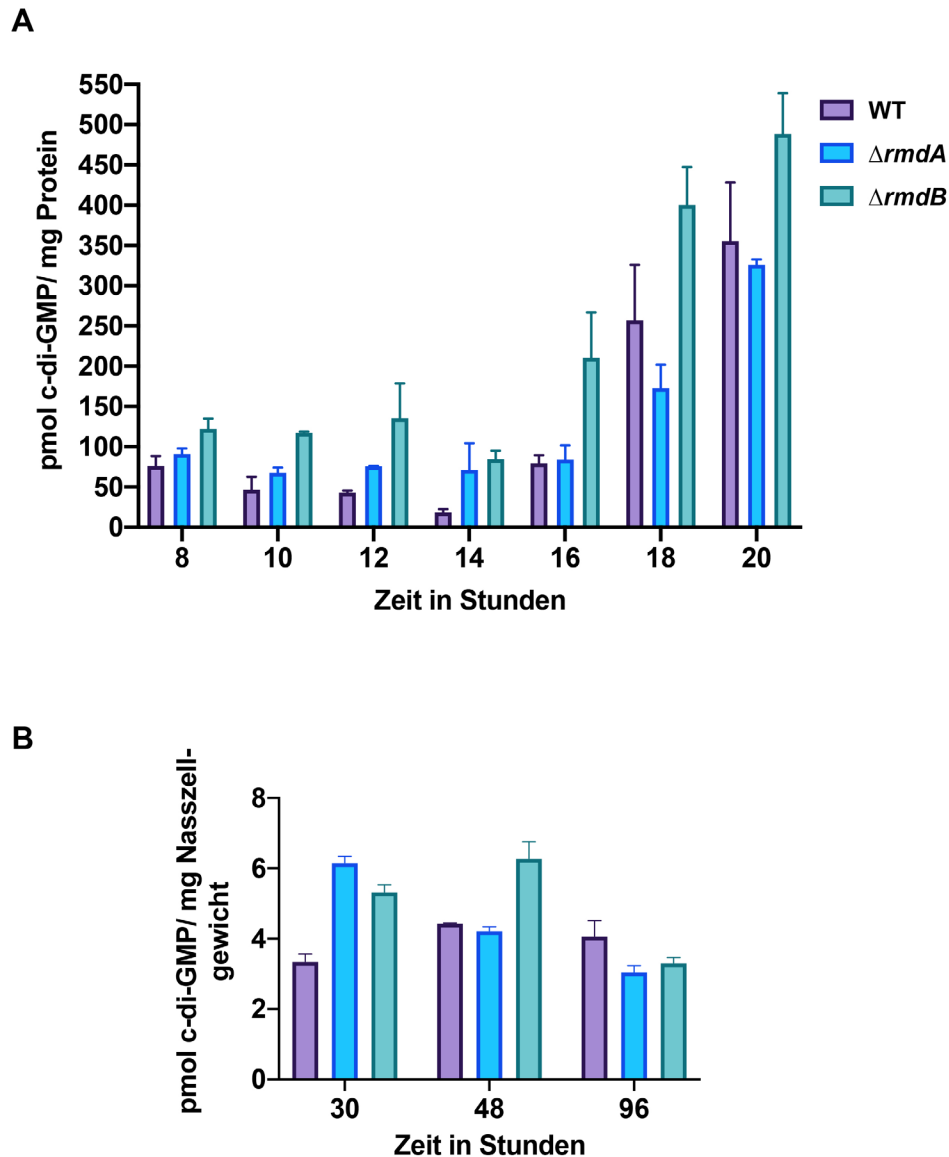


Abbildung 20: RmdB reguliert den globalen zellulären c-di-GMP-Spiegel über den gesamten Wachstumsverlauf, wohingegen RmdA in der frühen Entwicklungsphase Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration hat. **A:** Nukleotidextraktion aus *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kultiviert in MYM-Flüssigkultur über einen Zeitraum von 8-20 Stunden und berechnet in pmol c-di-GMP/mg Protein. Die zellulären c-di-GMP Konzentrationen sind in $\Delta rmdB$ zu allen gemessenen Zeitpunkten im Vergleich zum WT deutlich erhöht. In $\Delta rmdA$ sind die zellulären c-di-GMP Konzentrationen im Zeitraum 8-14 Stunden höher als im WT und gleichen sich im späteren Verlauf denen des WT an. Im WT sinken die zellulären c-di-GMP Konzentrationen zunächst bis Zeitpunkt 14 Stunden und steigen anschließend stark an. Dieser Trend ist tendenziell auch in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zu erkennen. **B:** Nukleotidextraktion aus *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ Makokolonien kultiviert auf MYM-Agarplatten über einen Zeitraum von 30-96 Stunden und berechnet in pmol c-di-GMP/mg Nasszellgewicht. Die zellulären c-di-GMP Konzentrationen sind in $\Delta rmdB$ zu den Zeitpunkten 30 und 48 Stunden im Vergleich zum WT deutlich erhöht, wohingegen sie in $\Delta rmdA$ nur zum Zeitpunkt 30 Stunden im Vergleich zum WT erhöht sind. Die zellulären c-di-GMP Konzentrationen im WT steigen zunächst leicht an und bleiben anschließend konstant. Alle Experimente wurden als biologische Triplikate durchgeführt, aus welchen ein Mittelwert gebildet wurde. Abhängig vom Zeitpunkt der Ernte von Makrokolonien bestand ein Replikat aus 4-8 Makrokolonien. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Wie aus Abbildung 20A und B hervorgeht, wird die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration in *S. venezuelae* durch die Deletion von *rmdA* und *rmdB* beeinflusst. Weiterhin zeigt die in Abbildung 20A aufgeführte Nukleotidextraktion aus MYM-Flüssigkultur vor allem in *S. venezuelae* WT einen Trend dahingehend, dass die c-di-GMP Konzentration über die Zeit zunächst absinkt und anschließend wieder stark zunimmt. Die Nukleotidextraktion aus *S. venezuelae* WT zeigt zunächst eine Abnahme der c-di-GMP Konzentration von ca. 75 pmol c-di-GMP/mg Protein bis zum Zeitpunkt 14 Stunden auf unter 20 pmol c-di-GMP/mg Protein, gefolgt von einem kontinuierlichen und starken Anstieg bis zum Zeitpunkt 20 Stunden, zu welchem ca. 350 pmol c-di-GMP/mg Protein ermittelt wurden. *S. venezuelae* $\Delta rmdA$ weist im Vergleich zum WT in der frühen Phase höhere c-di-GMP Konzentrationen auf. Zum Zeitpunkt 14 Stunden ist der größte Unterschied feststellbar, wobei die c-di-GMP Konzentration in $\Delta rmdA$ mit ca. 70 pmol c-di-GMP/mg Protein fast um das Vierfache im Vergleich zum WT erhöht ist. Im weiteren Verlauf gleicht sich die c-di-GMP Konzentration in $\Delta rmdA$ der des WT an und es ist kein Unterschied mehr zu erkennen. In *S. venezuelae* $\Delta rmdB$ sind die c-di-GMP Konzentrationen zu allen Zeitpunkten höher als in *S. venezuelae* WT und $\Delta rmdA$. Auch hier ist der größte Unterschied zum WT zu Zeitpunkt 14 Stunden ermittelt worden, wobei die c-di-GMP Konzentration in $\Delta rmdB$ um fast das Fünffache erhöht ist. In der späten Phase der Messungen verringert sich der Konzentrationsunterschied zwischen $\Delta rmdB$ und dem WT wieder. In $\Delta rmdB$ wird zum Zeitpunkt 20 Stunden mit ca. 500 pmol c-di-GMP/mg Protein die höchste c-di-GMP Konzentration gemessen.

Die in Abbildung 20B aufgeführten Ergebnisse zur zellulären Konzentration an c-di-GMP aus Zellmaterial, welches auf Festmedium kultiviert wurde, weisen im Vergleich zu den Ergebnissen aus Flüssigkultur keinen eindeutigen Trend auf. Die c-di-GMP Konzentration steigt in *S. venezuelae* WT zwischen Zeitpunkt 30 Stunden um ein Drittel von 3,3 auf 4,4 pmol c-di-GMP/mg Nasszellgewicht an und verringert sich zum Zeitpunkt 96 Stunden wieder auf 4 pmol c-di-GMP/mg Nasszellgewicht. In *S. venezuelae* $\Delta rmdA$ ist die c-di-GMP Konzentration zum Zeitpunkt 30 Stunden mit 6,1 pmol c-di-GMP/mg Nasszellgewicht im Vergleich zum WT erhöht. Zu den späteren Zeitpunkten gleicht sich die c-di-GMP Konzentration der des WT an. *S. venezuelae* $\Delta rmdB$ weist zu den Zeitpunkten 30 und 48 Stunden mit 5,3 und 6,3 pmol c-di-GMP/mg Nasszellgewicht im Vergleich zum WT höhere c-di-GMP Konzentrationen auf. Zu Zeitpunkt 96 Stunden gleicht sich die c-di-GMP Konzentration der des WT an.

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Nukleotidextraktionen kann geschlossen werden, dass insbesondere die Deletion von *rmdB* einen großen Einfluss auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration hat. Aber auch in $\Delta rmdA$ konnten, vor allem während den frühen Zeitpunkten, im Vergleich zum WT erhöhte c-di-GMP Konzentrationen festgestellt werden. Weiterhin zeigen insbesondere die Ergebnisse der Nukleotidextraktionen aus *S.*

venezuelae WT, kultiviert in Flüssigmedium, dass die c-di-GMP Konzentrationen im Verlauf der Entwicklung einem Trend folgen und zunächst sinken und dann wieder stark ansteigen. In *S. venezuelae* WT korreliert dabei die niedrigste gemessene c-di-GMP Konzentration zu Zeitpunkt 14 Stunden mit der anschließend beobachteten Einleitung der reproduktiven Wachstumsphase. Mit den Nukleotidextraktionen aus Makrokolonien konnte gezeigt werden, dass die c-di-GMP Konzentrationen in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ im Vergleich zu WT zunächst beide erhöht sind und in $\Delta rmdB$, anders als in $\Delta rmdA$, auch zu Zeitpunkt 48 Stunden erhöht bleiben.

2.4.2 Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* hat signifikanten Einfluss auf das Transkriptom von *S. venezuelae*

Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* führt zu einem ausgeprägten Phänotyp, welcher sich in einer deutlich verzögerten Entwicklungsgeschwindigkeit äußert. Entsprechend sollte nun untersucht werden, welchen globalen Einfluss die Deletion von *rmdA* und *rmdB* auf das Transkriptom von *S. venezuelae* hat. Dazu wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt, basierend auf mRNA-Sequenzierung nach Isolation der Gesamt-RNA aus *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ (s. 4.6.1 und 4.6.5). Die eingesetzten Stämme wurden als Makrokolonien auf MYM-Agar kultiviert (s. 4.3.2 und 4.8.2) und nach 30 Stunden geerntet. Wie in Abbildung 6A gezeigt, ist zu diesem Zeitpunkt der phänotypische Unterschied zwischen *S. venezuelae* WT und den Deletionsmutanten deutlich ausgeprägt. Weiterhin konnten mittels der durchgeführten Nukleotidextraktionen (s. 2.4.1) gezeigt werden, dass die c-di-GMP Konzentration zu Zeitpunkt 30 Stunden in beiden Deletionsstämmen erhöht ist. Entsprechend wurde vermutet, dass insbesondere BldD-Zielgene in den Deletionsstämmen differenziell reguliert sind.

Die Gesamt-RNA wurde, wie in 4.6.1 beschrieben, isoliert und die Qualität und Integrität der RNA mittels Chip-basierter Auftrennung im *Bioanalyzer* analysiert (s. 4.6.3). Die rRNA-Depletion und die mRNA-Sequenzierung wurde im Auftrag durch die *vertis Biotechnologie AG* durchgeführt (s. 4.6.5). Die bioinformatische Auswertung der mRNA-Sequenzierung wurde in Kooperation mit Mahmoud Al Bassam und der *University of California* (San Diego) durchgeführt (s. 4.6.5) (Haist et al. 2020). In Abbildung 21 ist die Gesamtzahl der Gene und die Anzahl an BldD-Zielgenen aufgeführt, welche in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differenziell zum WT reguliert sind.

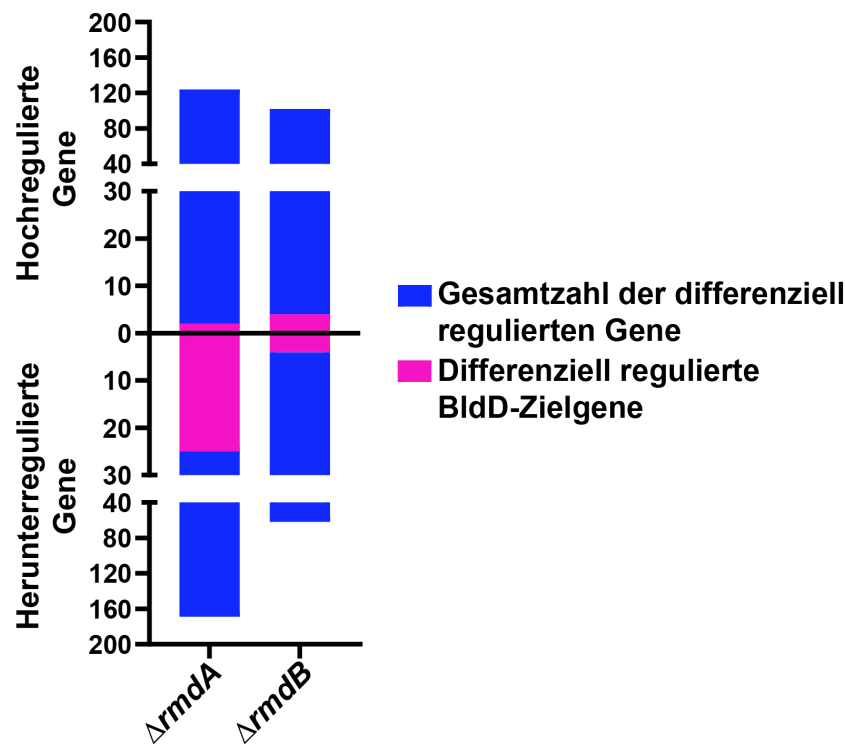


Abbildung 21: Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* führt zu einer signifikanten differenziellen Regulation von insgesamt 457 Genen, darunter auch BldD-Zielgene. In $\Delta rmdA$ sind insgesamt 293 Gene differenziell reguliert, davon sind im Vergleich zum WT 124 hoch- und 169 herunterreguliert. Weiterhin sind in $\Delta rmdA$ 27 BldD-Zielgene differenziell reguliert, wobei 2 hoch- und 25 herunterreguliert sind. In $\Delta rmdB$ sind insgesamt 164 Gene differenziell reguliert, davon sind im Vergleich zum WT 102 hoch- und 62 herunterreguliert, wobei jeweils 4 BldD-Zielgene hoch bzw. herunterreguliert sind. Gene welche zweifach ($\log_2 >1 / <-1$; $p < 0.05$) differenziell reguliert sind, wurden als signifikant betrachtet.

Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, sind in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ eine Vielzahl von Genen differenziell zum WT reguliert, darunter auch BldD-Zielgene. Dabei wurden Gene, welche zweifach ($\log_2 >1 / <-1$; $p < 0.05$) differenziell reguliert sind, als signifikant betrachtet. In $\Delta rmdA$ sind im Vergleich zum WT 293 Gene differenziell reguliert, was einen Anteil von 3,9% aller 7512 *open reading frames* (ORF) in *S. venezuelae* entspricht. Hiervon sind 124 Gene erhöht exprimiert und 169 Gene geringer exprimiert. In $\Delta rmdB$ sind im Vergleich zum WT 164 Gene differenziell reguliert, was einen Anteil von 2,2% aller bekannter ORFs entspricht. Hiervon sind 102 Gene erhöht exprimiert und 62 Gene geringer exprimiert.

Von den 282 durch BldD regulierten Genen sind in $\Delta rmdA$ 2 hoch- und 25 herunterreguliert, was etwa 9% des BldD-Regulons entspricht. In $\Delta rmdB$ sind je vier BldD Zielgene hoch- bzw. herunterreguliert, was etwa 3% des BldD-Regulons entspricht.

In Abbildung 22 ist grafisch dargestellt, wie viele identische Gene sowohl in $\Delta rmdA$ als auch $\Delta rmdB$ differenziell reguliert sind.

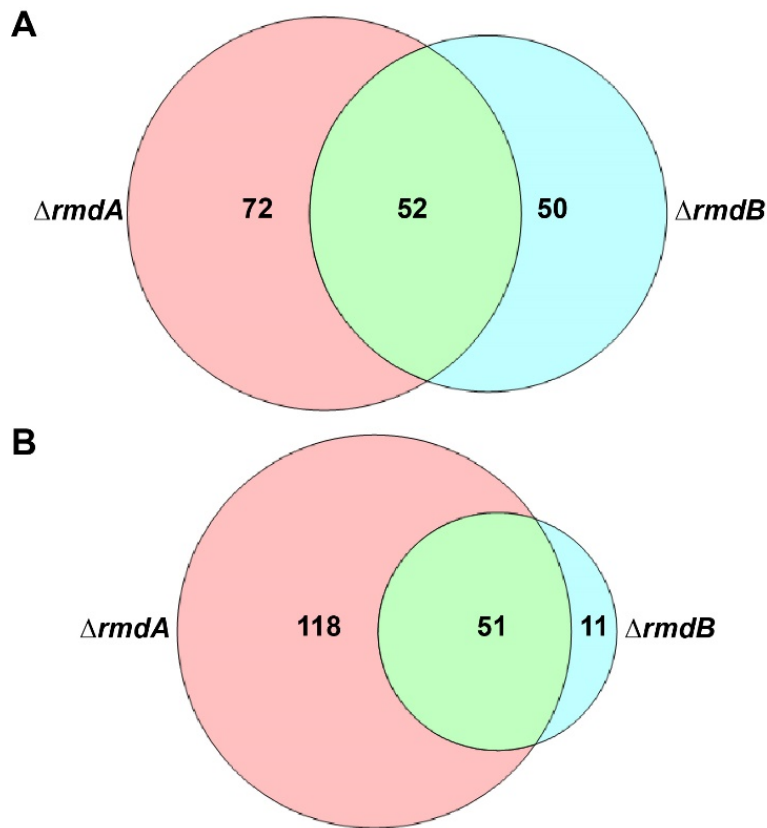


Abbildung 22: Viele der in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differenziell regulierten Gene sind identisch. Vergleich der in $\Delta rmdA$ (rot) und $\Delta rmdB$ (blau) identisch (grün) differenziell regulierten Gene mittels Venn-Diagramm. **A:** Von den 226 hochregulierten Gene in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind 52 identisch. **B:** Von den 231 runterregulierten Genen in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind 51 identisch.

Wie aus Abbildung 22A und B hervorgeht, gibt es bei den hochregulierten und bei den herunterregulierten Genen in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ deutliche Überschneidungen. Zusammengefasst sind 23% der totalen Anzahl der differenziell regulierten Gene in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ identisch. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Anzahl der differenziell regulierten Gene in $\Delta rmdA$ höher ist als in $\Delta rmdB$.

In Abbildung 23 ist ein *Heatmap*-Diagramm mit in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differenziell regulierten Genen aufgeführt, die für Faktoren und Regulatoren kodieren, welche in *S. venezuelae* nachweislich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einnehmen (s. 1.1 und 1.2).

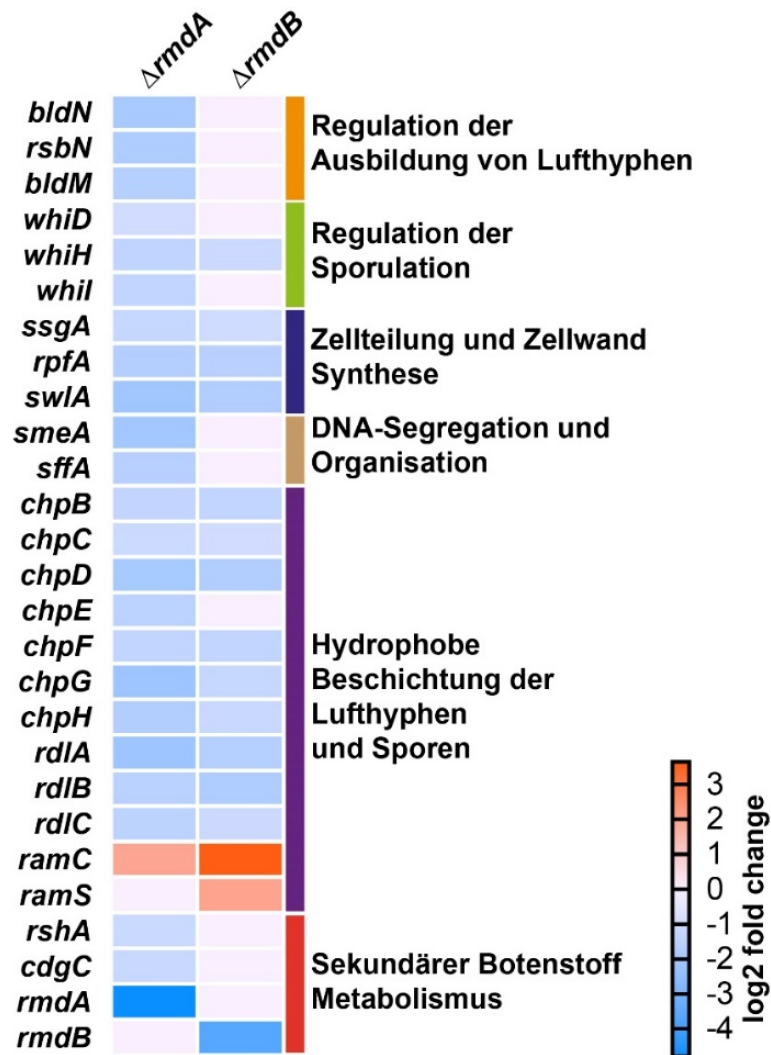


Abbildung 23: Einige Gene, die für Faktoren und Regulatoren kodieren, welche einen Einfluss auf die Regulation der Entwicklung von *S. venezuelae* haben, sind in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differenziell reguliert. Heatmap-Diagramm mit den in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ differenziell regulierten Genen, eingeteilt in Funktionsgruppen. Gene, welche zweifach ($\log_2 > 1 / < -1$; $p < 0.05$) differenziell reguliert sind, wurden als signifikant betrachtet.

Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, sind in $\Delta rmdA$ und- oder $\Delta rmdB$ einige Gene differenziell reguliert, welche für Faktoren und Regulatoren kodieren, die bei der Entwicklungsregulation von *S. venezuelae* wichtige Funktionen einnehmen.

Die Expression von *bldN*, *rsbN* und *bldM*, welche für die Proteine σ^{BldN} , RsbN und BldM kodieren, sind in $\Delta rmdA$ signifikant herunterreguliert. Diese drei Proteine sind während der frühen reproduktiven Wachstumsphase für die Regulation der Ausbildung von Lufthyphen und der Einleitung der Sporulation verantwortlich, wobei RsbN die Aktivität von σ^{BldN} durch Bindung inaktiviert (Bibb et al. 2012). Das Regulon von σ^{BldN} umfasst neben *bldM* unter anderem die *chp*- und *rdl*- Genen, die für die Chaplin- und Rhodlin-Proteine kodieren, aus welchen die hydrophobe Schicht der Lufthyphen aufgebaut wird (Bibb, Molle, and Buttner 2000; Bibb et al. 2012). Wie ersichtlich wird, sind die Chaplin kodierenden Gene *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpF* *chpG*

und *chpH* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sowie *chpE* in $\Delta rmdA$ signifikant herunterreguliert. Auch die Rhodlin kodierenden Gene *rdIA*, *rdIB* und *rdIC* sind in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ signifikant herunterreguliert.

Im Gegensatz dazu ist das für die SapB generierende Synthetase RamC kodierende Gen, *ramC*, in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ signifikant hochreguliert, wobei das für SapB kodierende Gen *ramS* nur in $\Delta rmdB$ signifikant hochreguliert ist. Es ist bekannt, dass SapB unter nährstoffreichen Wachstumsbedingungen zur Ausbildung der hydrophoben Schicht gebildet wird (Willey et al. 1991; Kodani et al. 2004; Capstick et al. 2007).

Der Transkriptionsregulator BldM aktiviert zunächst als Homodimer unter anderem die Expression von weiteren Regulator kodierenden Genen wie *whiB* und *ssgR* (Al-Bassam et al. 2014). So aktiviert SsgR die Expression von *ssgA*, welches neben *rpfA* und *swIA* ebenfalls in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ signifikant herunterreguliert ist (Traag, Kelemen, and Van Wezel 2004). Die Gene *ssgA*, *rpfA* und *swIA* kodieren für die Proteine SsgA, RpfA und SwIA, welche bei der Zellteilung und Zellwandsynthese eine Rolle spielen. SsgA ist bei der Assemblierung und Lokalisation von FtsZ beteiligt, wohingegen RpfA und SwIA Zellwandhydrolasen darstellen und für die Zellwandmodellierung zuständig sind (Haiser, Yousef, and Elliot 2009). Weiterhin bildet BldM mit WhiL ein Heterodimer aus, welches unter anderem die Expression des *smeA-ssfA* Operons reguliert, wobei dieses in $\Delta rmdA$ signifikant herunterreguliert ist (Al-Bassam et al. 2014). Das *smeA-ssfA* Operon kodiert für putative DNA-Translokase SsfA, welche an der Segregation der Chromosomen in die Prä-Sporen beteiligt ist und von SmeA an die Septierungsstellen lokalisiert wird (Ausmees et al. 2007; Ditkowski et al. 2013).

Mit *whiD* und *whiL* in $\Delta rmdA$ sowie *whiH* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ ist die Expression von Genen signifikant herunterreguliert, welche für Whi-Transkriptionsregulatoren WhiD, WhiL und WhiH kodieren. WhiH weist als GntR-ähnlicher Transkriptionsfaktor ein großes Regulon an Sporulations-wichtigen Genen auf (Persson, Chater, and Flardh 2013; Gallagher et al. 2020). WhiL bildet ein Heterodimer mit BldM aus, welches unter anderem die Expression der Gene *smeA-ssfA* aktiviert (Al-Bassam et al. 2014).

Weiterhin sind *rshA* und *cdgC* in $\Delta rmdA$ signifikant herunterreguliert, welche für die (p)ppGpp-Synthetase RshA bzw. für die Diguanylatzyklase CdgC kodieren (Sun, Hesketh, and Bibb 2001; Al-Bassam et al. 2018). Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* spiegelt sich auch in einer signifikant verringerten Expression der entsprechenden Gene in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ wider.

Aus der vergleichenden Transkriptionsanalyse kann abgeleitet werden, dass die Deletion von *rmdA* und *rmdB* zu signifikanten Veränderungen im Transkriptom von *S. venezuelae* führt. In $\Delta rmdA$ wurden dabei deutlich mehr differenziell zum WT regulierte Gene identifiziert als in

ΔrmdB. Bezogen auf die totale Anzahl der in *ΔrmdA* und *ΔrmdB* differenziell regulierten Gene zeigt sich eine Überschneidung von 23%, was verdeutlicht, dass RmdA und RmdB neben einem gemeinsamen auch ein spezifisches Set an Genen beeinflussen. Unter diesen differenziell regulierten Genen sind auch BldD-Zielgene, wobei die Anzahl dieser geringer ausfiel als erwartet. Dennoch konnten in *ΔrmdA* und *ΔrmdB* differenziell regulierte Gene identifiziert werden, deren kodierende Proteine während der Entwicklung von *S. venezuelae* wichtige Funktion einnehmen. Die überwiegende Anzahl der differenziell regulierten Gene in *ΔrmdA* und *ΔrmdB* kodieren für Proteine deren Funktion bislang nicht charakterisiert wurde, oder deren Funktion nicht mit der Differenzierung von *S. venezuelae* assoziiert wird.

2.4.3 Einige Ergebnisse der Transkriptomanalyse konnten durch qRT-PCR Experimente validiert werden

Um die Transkriptomanalyse validieren zu können, wurde die Expression einiger wichtiger Gene mittels qRT-PCR Experimenten analysiert. Die Expression folgender Zielgene wurde untersucht: *bldM*, *bldN*, *chpC*, *chpE* und *chpH*. Die qRT-PCR Experimente wurden, wie in 4.6.6 beschrieben, durchgeführt und dabei Präparationen derselben RNA eingesetzt, welche auch für die RNA-Sequenzierung genutzt wurde. Um eine differenzielle Regulierung im Vergleich zum WT analysieren zu können, wurden die qRT-PCR Experimente auch mit RNA aus *S. venezuelae* WT durchgeführt. Das Gen *hrdB*, welches über den gesamten Lebenszyklus von *S. venezuelae* konstitutiv exprimiert wird, wurde zur Normalisierung der Ergebnisse herangezogen (s. 4.6.6). Die Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCR Experimente sind in Abbildung 24 aufgeführt.

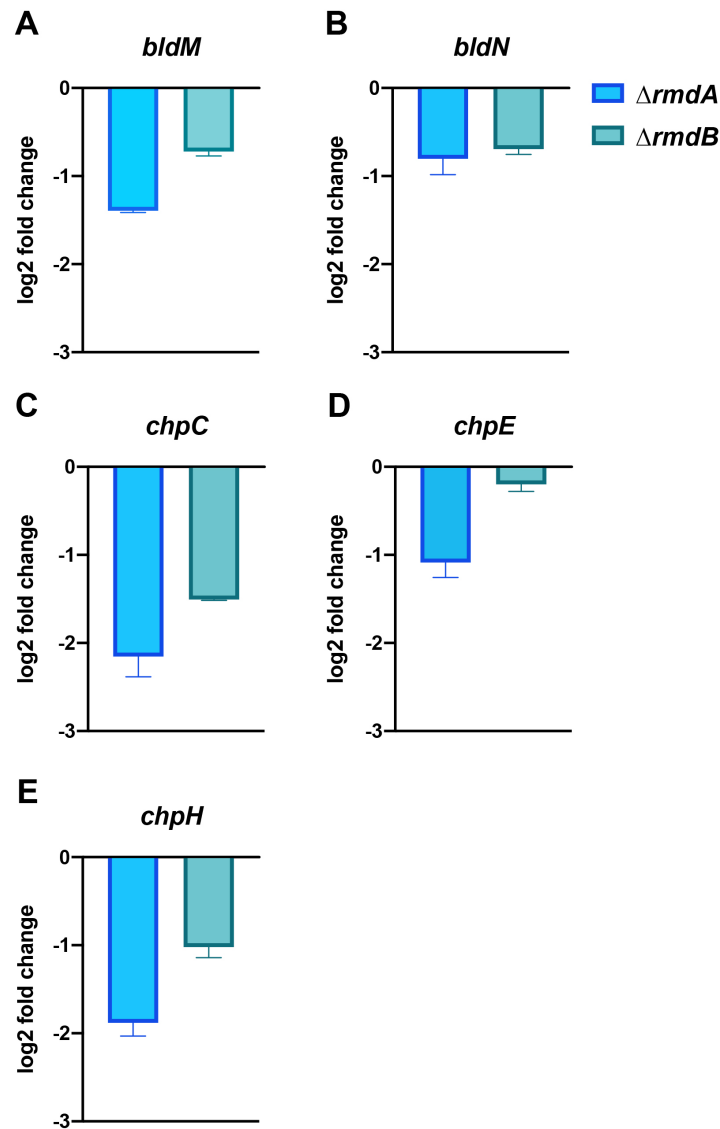


Abbildung 24: Die Gene *bldM* und *chpE* in *ΔrmdA* sowie die Gene *chpC* und *chpH* in *ΔrmdA* und *ΔrmdB* sind im Vergleich zum WT differenziell exprimiert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von *bldM*, *bldN*, *chpC*, *chpE* und *chpH* in *S. venezuelae* WT, *ΔrmdA* und *ΔrmdB* untersucht. Die Expressionswerte wurden relativ zu der mRNA Akkumulation des konstitutiv exprimierten Gens *hrdB* berechnet und mit den Expressionswerten des WT normalisiert. Gene, welche zweifach ($\log_2 >1/<-1$; $p < 0.05$) differenziell reguliert sind, wurden als signifikant betrachtet. Alle Experimente wurden als biologische Triplikate durchgeführt, aus welchen ein Mittelwert gebildet wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Wie aus Abbildung 24A-E hervorgeht, konnten einige Ergebnisse der Transkriptomanalyse mittels der durchgeführten qRT-PCR Experimente validiert oder zumindest in ihrer Tendenz bestätigt werden.

Die Expression des für den Transkriptionsregulator BldM kodierenden Gens *bldM* ist in *ΔrmdA* signifikant und in *ΔrmdB* nicht signifikant herunterreguliert. Auch die Expression der Chaplin-Proteine kodierenden Gene *chpC* und *chpH* sind in *ΔrmdA* und *ΔrmdB* sowie *chpE* in *ΔrmdA* signifikant herunterreguliert. Die Expression des Gens *bldN* ist in beiden Deletionsstämmen laut qRT-PCR Ergebnissen nicht signifikant herunterreguliert.

Die durchgeführten qRT-PCR Experimente unterstreichen die Ergebnisse der Transkriptomanalyse, wohingegen *bldM*, *chpC*, *chpE* und *chpH* in $\Delta rmdA$ herunterreguliert sind. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass *chpC* und *chpH* in $\Delta rmdB$ herunterreguliert sind. Das Gen *bldN* ist laut qRT-PCR in $\Delta rmdA$ nicht signifikant herunterreguliert. Dieses Ergebnis bestätigt jedoch die Tendenz der Transkriptomanalyse, in welcher *bldN* als signifikant herunterreguliert identifiziert wurde.

2.4.4 Folgeexperimente zu den Ergebnissen der globalen Analysen

Aufgrund der umfangreichen Erkenntnisse, welche aus der Transkriptomanalyse gewonnen werden konnten, sollten nun Experimente durchgeführt werden, um den Einfluss einiger als differenziell exprimiert identifizierten Gene in *S. venezuelae* $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zu untersuchen. Als Kandidaten wurden die Chaplin kodierenden Gene *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpE*, *chpF* und *chpH* ausgewählt, da diese laut Transkriptionsanalyse bis auf *chpE* sowohl in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ herunterreguliert sind (s. Abbildung 23). Die Chaplinproteine bilden die hydrophobe Schicht der Lufthyphen, die das Durchbrechen der wässrigen Phase erst ermöglicht (Bibb et al. 2012). Weiterhin wurden die Gene *bldM* und *bldN* als Kandidaten gewählt, da sie laut Transkriptionsanalyse in $\Delta rmdA$ signifikant herunterreguliert werden (s. Abbildung 23). Das Gen *bldM* kodiert für den Transkriptionsregulator BldM, welcher sowohl für die Einleitung der frühen, als auch in der fortgeschrittenen Sporulationsphase essenziell ist (Al-Bassam et al. 2014). Das Gen *bldN* wiederum kodiert für den Sigmafaktor σ^{BldN} und reguliert unter anderem die Transkription der *chp*-Gene und von *bldM* (Bibb, Molle, and Buttner 2000; Bibb et al. 2012). Die genannten Gene sollten nun in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ konstitutiv exprimiert werden und mittels phänotypischer Untersuchungen geklärt werden, ob diese den Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ beeinflussen.

2.4.4.1 Die konstitutive Expression von *chpD*, *chpE*, *chpF* und *chpH* führt zur partiellen Suppression des $\Delta rmdB$ Phänotyps

Die Chaplin kodierenden Gene *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpE*, *chpF*, *chpG* und *chpH* sind laut Transkriptomanalyse in $\Delta rmdA$ und bis auf *chpE* auch in $\Delta rmdB$ signifikant herunterreguliert (s. Abbildung 23). Dies konnte mittels qRT-PCR für *chpC* und *chpH* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sowie *chpE* in $\Delta rmdA$ validiert werden (s. Abbildung 24). Welchen Einfluss dies auf die Hydrophobizität der Stämme hat, sollte mit einem Wassertest (s. 4.8.2) untersucht werden. Dabei wurden *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ auf MYM-Agar als Makrokolonien kultiviert (s. 4.3.2 und 4.8.2) und nach zwei Tagen ein mit Coomassie-Brilliant-Blue versetzter Wassertropfen auf die Kolonien getropft. Das Ergebnis des Wassertests ist in Abbildung 25 aufgeführt.

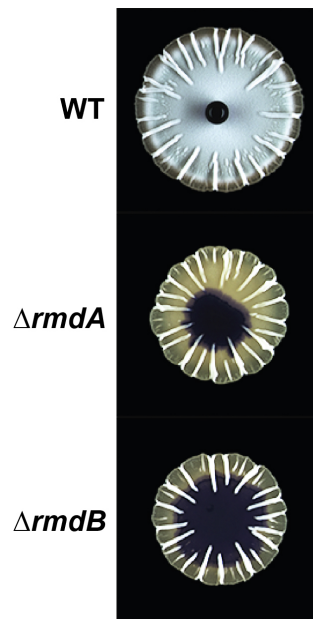


Abbildung 25: Makrokolonien der Stämme $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind im Gegensatz zu *S. venezuelae* WT nach 48 Stunden nicht hydrophob. Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kultiviert auf MYM-Agar und fotografiert nach 48 Stunden Wachstum. Das zum Wassertest eingesetzte Wasser wurde mit Coomassie-Brilliant-Blue versetzt. Makrokolonien wurden durch das Tropfen von $12\mu\text{l } 2 \times 10^5 \text{ CFU}/\mu\text{l}$ auf MYM-Agar kultiviert.

Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, sind $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zum Zeitpunkt 48 Stunden im Gegensatz zu *S. venezuelae* WT nicht hydrophob. Der gefärbte Wassertropfen zerfließt auf den als Makrokolonien kultivierten Stämmen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$, wohingegen er auf *S. venezuelae* WT als Tropfen erhalten bleibt. Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass sich die in der Transkriptomanalyse und den qRT-PCR Experimenten festgestellte herunterregulierte Expression der Chaplin kodierenden Gene in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$, durch das Ausbleiben der Ausbildung der hydrophoben Schicht zu diesem Zeitpunkt äußert.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die in der Transkriptionsanalyse festgestellte herunterregulierte Expression der Chaplin kodierenden Gene in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ durch konstitutive Expression der *chp*-Gene in diesen Stämmen kompensiert werden kann und ob sich dies auf die Phänotypen von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ auswirkt. Die Gene *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpE*, *chpF* und *chpH* wurden unter Transkriptionskontrolle des konstitutiven Promoters *ermE*^{*} in pMS82 kloniert (s. Tabelle 7), in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ konjugiert und in die integrative Phagenstelle *attB*_{ΦBT1} integriert (s. 4.5.14). Als Kontrolle wurde pMS82 als Leerplasmid in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ konjugiert und im weiteren Verlauf mitgeführt. Die konstruierten Stämme wurden auf MYM-Agar als Makrokolonien kultiviert (s. 4.3.2 und 4.8.2) und über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich fotografiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 26A und B aufgeführt.

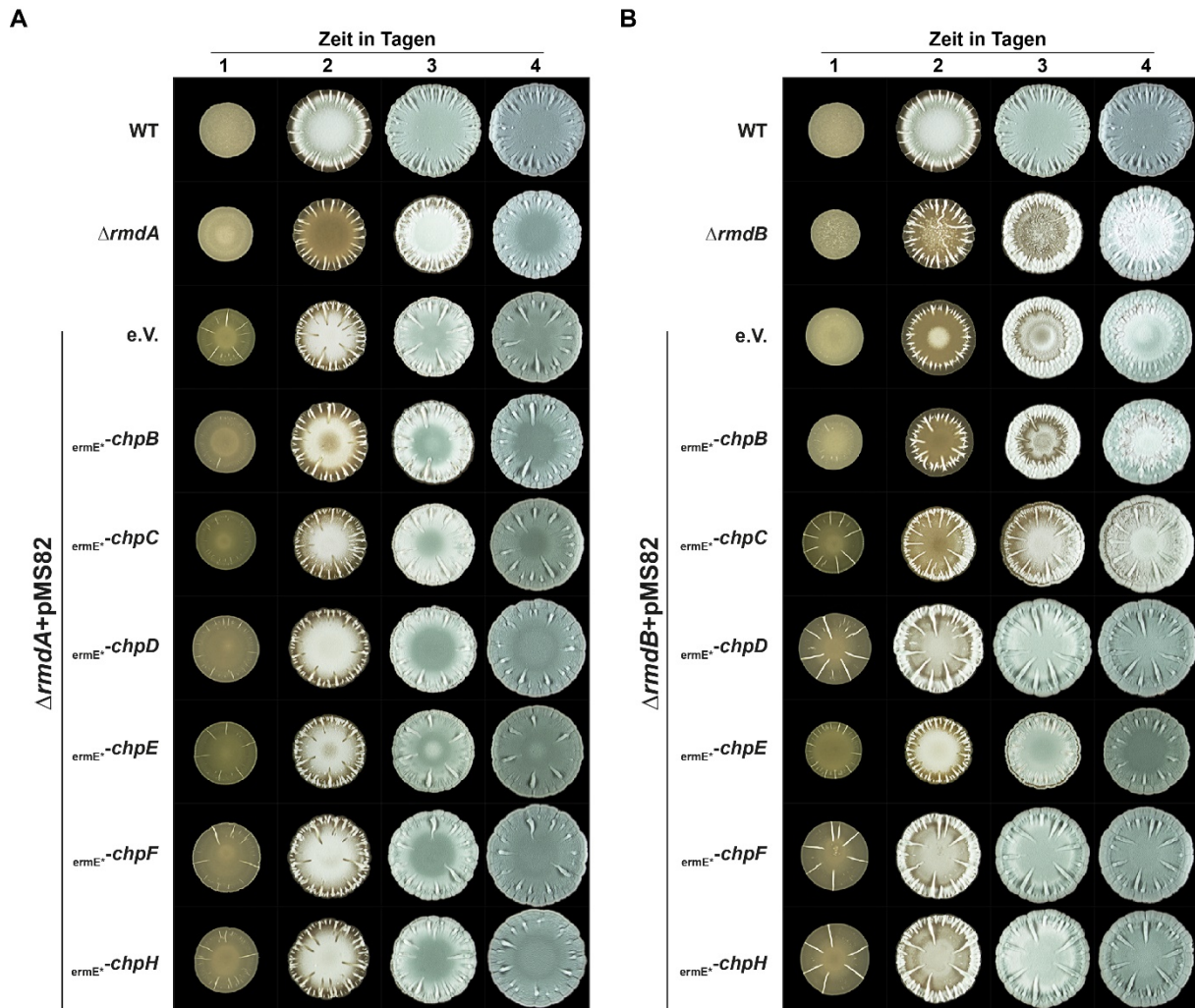


Abbildung 26: Die konstitutive Expression von *chpD*, *chpE*, *chpF* und *chpH* unterdrückt partiell den Phänotyp von $\Delta rmdB$. Die konstitutive Expression der für Chaplin-Proteine kodierenden Gene *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpE*, *chpF* sowie *chpH* von pMS82 in $\Delta rmdA$ bewirken eine beschleunigte Entwicklung, welche aber als unspezifisch betrachtet werden muss da die Leerplasmidkontrolle $\Delta rmdA$ + pMS82 denselben Phänotyp aufweist.. Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$, $\Delta rmdA$ + pMS82, $\Delta rmdA$ + pMS82-*chpB*/ -*chpC*/ -*chpD*/ -*chpE*/ -*chpF* sowie -*chpH* $\Delta rmdB$, $\Delta rmdB$ + pMS82, $\Delta rmdB$ + pMS82-*chpB*/ -*chpC*/ -*chpD*/ -*chpE*/ -*chpF* und -*chpH* kultiviert auf MYM-Agar über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Makrokolonien wurden durch das Tropfen von 12 μ l 2×10^5 CFU/ μ l auf MYM-Agar kultiviert. Empty Vector (e. V.) beschreibt die Kontrolle mit dem Leerplasmid pMS82.

Wie aus Abbildung 26B hervorgeht, unterdrückt die konstitutive Expression von *chpD*, *chpE*, *chpF* und *chpH* den Phänotyp von $\Delta rmdB$ teilweise. Diese Stämme zeigen im Vergleich zu $\Delta rmdB$ bereits zu Zeitpunkt 2 Tage durch Weißfärbung der Kolonien die Ausbildung von Lufthyphen und nach 3 Tagen die Bildung von Sporen, was durch die Grünfärbung der Kolonien erkennbar ist. Die konstitutive Expression von *chpB* und *chpC* und die Kontrolle mit pMS82 Leerplasmid hat wiederum keinen Einfluss auf den Phänotyp von $\Delta rmdB$. Diese Stämme zeigen denselben verzögerten Phänotyp wie $\Delta rmdB$. Wie aus Abbildung 26A hervorgeht, zeigt die Kontrolle mit $\Delta rmdA$ und integriertem Leervektor pMS82 im Vergleich zu $\Delta rmdA$ eine beschleunigte Entwicklung. Entsprechend müssen die ersichtlichen

phänotypischen Veränderungen in den Stämmen mit konstitutiv exprimierten *chp*-Genen als unspezifischer Effekt betrachtet werden.

Aus den Ergebnissen diese Experiments kann geschlossen werden, dass die konstitutive Expression der Chaplin kodierenden Gene in $\Delta rmdB$ teilweise zu einer partiellen Suppression des Phänotyps führen, wohingegen in $\Delta rmdA$ nur ein unspezifischer Effekt zu erkennen ist, welcher auch in der Kontrolle auftritt.

2.4.4.2 Die konstitutive Expression von *bldM* und *bldN* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ unterdrückt den Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ vollständig

Entsprechend der Ergebnisse der Transkriptomanalyse und der qRT-PCR-Experimente sind die Gene *bldM* und *bldN* in $\Delta rmdA$, aber nicht in $\Delta rmdB$ signifikant herunterreguliert (s. Abbildung 23 und Abbildung 24). Wie beschrieben kodieren diese Gene für die Regulatoren Sigmafaktor σ^{BldN} und BldM, welche Einfluss auf die Entwicklung von *S. venezuelae* haben und unter anderem die Transkription der *chp*-Gene regulieren und sowohl während der frühen als auch in der späten Sporulationsphase die Expression von essenziellen Faktoren aktivieren (Bibb et al. 2012; Al-Bassam et al. 2014). Entsprechend wurde erwartet, dass eine konstitutive Expression von *bldM* und *bldN* die verzögerte Entwicklung $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kompensieren kann.

Um dies zu bestätigen, wurden die Gene *bldN* und *bldM* unter Transkriptionskontrolle des konstitutiven Promoters *ermE** in pIJ10257 kloniert (s. Tabelle 7) und die Konstrukte in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ exprimiert. Als Kontrolle wurde *bldM* und *bldN* von pIJ10257 auch in *S. venezuelae* WT exprimiert und im weiteren Verlauf mitgeführt. Die generierten Stämme wurden auf MYM-Agar als Makrokolonien kultiviert (s. 4.3.2 und 4.8.2) und über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich fotografiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 aufgeführt.

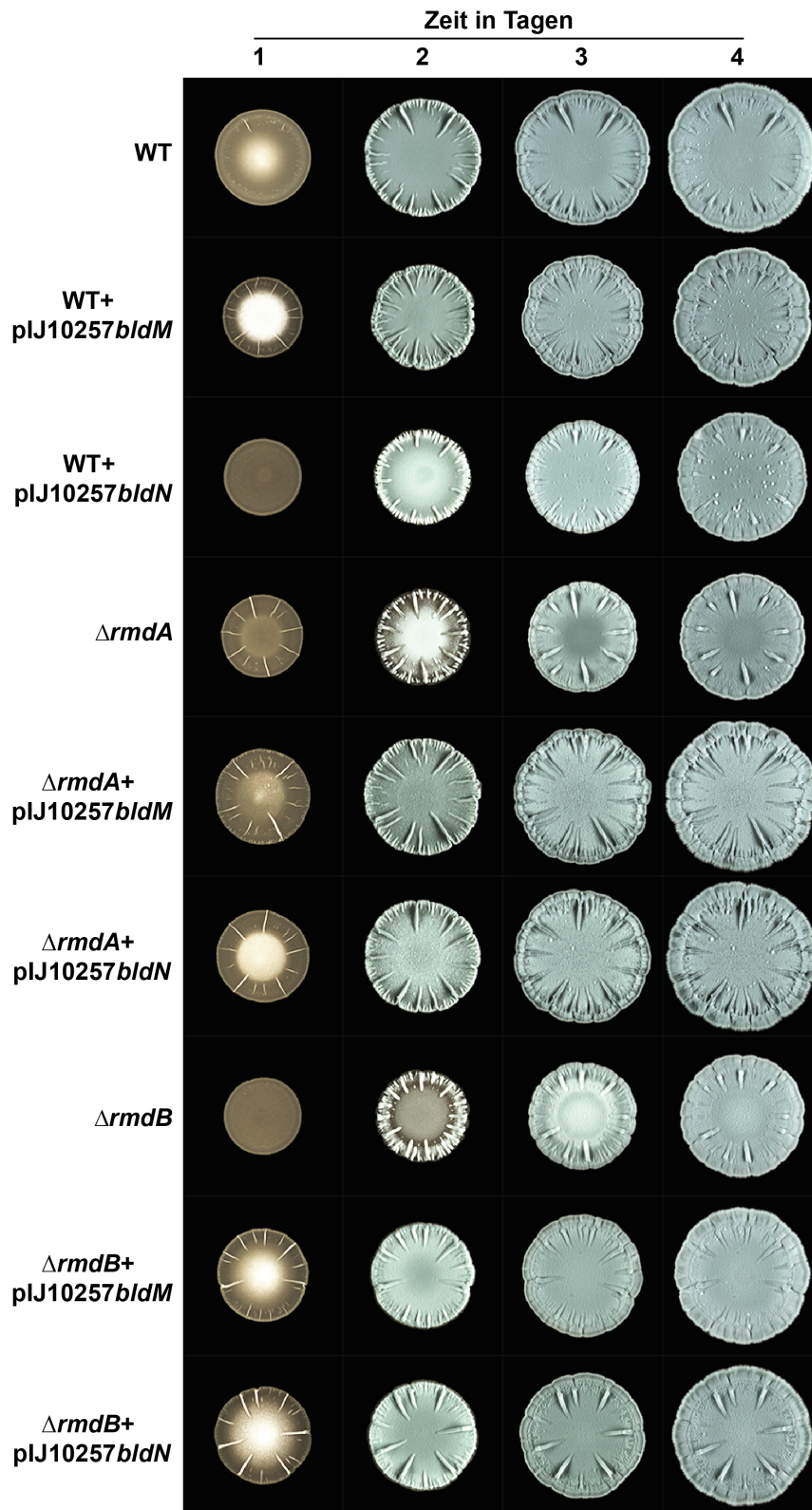


Abbildung 27: Die konstitutive Expression von *bldM* und *bldN* führt zur Unterdrückung der Phänotypen von Δ *rmdA* und Δ *rmdB*. Die konstitutive Expression von *bldM* und *bldN* hat keinen Einfluss auf die Entwicklung des WT. Makrokolonien von *S. venezuelae* WT, WT+ pIJ10257, WT+ pIJ10257-*bldM*, WT+ pIJ10257-*bldN*, Δ *rmdA*, Δ *rmdA*+ pIJ10257-*bldM*, Δ *rmdA*+ pIJ10257-*bldN*, Δ *rmdB* und Δ *rmdB*+ pIJ10257-*bldM*, Δ *rmdB*+ pIJ10257-*bldN* kultiviert auf MYM-Agar über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Makrokolonien wurden durch das Tropfen von 12 μ l 2x10⁵ CFU/ μ l auf MYM-Agar kultiviert.

Wie aus Abbildung 27 hervorgeht, unterdrückt die konstitutive Expression von *bldM* und *bldN* die Phänotypen von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$. Die Stämme $\Delta rmdA+$ pIJ10257-*bldM*, $\Delta rmdA+$ pIJ10257-*bldN*, sowie $\Delta rmdB+$ pIJ10257-*bldM* und $\Delta rmdB+$ pIJ10257-*bldN* zeigen eine ähnliche Entwicklungsgeschwindigkeit wie *S. venezuelae* WT, wobei bereits nach zwei Tagen Sporen gebildet werden, was sich durch Grünfärbung der Kolonien zeigt. Die zur Kontrolle durchgeführte konstitutive Expression von *bldM* und *bldN* in *S. venezuelae* WT hat keinen Einfluss auf den Entwicklungsverlauf.

Aus den Ergebnissen dieses Experiments kann der Schluss gezogen werden, dass die konstitutive Expression der BldM und σ^{BldN} kodierenden Gene *bldM* und *bldN* die verzögerte Entwicklung von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ wie erwartet unterdrücken kann.

2.5 Experimente zur Identifizierung von Interaktionspartnern von RmdA und RmdB

In Streptomyceten wird c-di-GMP über die c-di-GMP-Effektoren BldD und RsiG in die Entwicklungsregulation integriert (Tschowri et al. 2014; Gallagher et al. 2020). DGCs und PDEs regulieren die zelluläre Konzentration an c-di-GMP, wobei diese mittels unterschiedlicher Domänen spezifische Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen können (Jenal, Reinders, and Lori 2017; Richter et al. 2020). In folgenden Experimenten sollte nun untersucht werden, ob RmdA und oder RmdB mit bekannten c-di-GMP Effektoren wie RsiG oder BldD sowie wichtigen Transkriptionsregulatoren wie BldM oder Sigmafaktoren wie σ^{BldN} und σ^{WhiG} interagieren können. Mögliche Interaktionen wurden durch verschiedene experimentelle Ansätze untersucht.

2.5.1 RmdB und σ^{WhiG} interagieren in Co-Elutionsstudien

Sigmafaktor σ^{WhiG} interagiert mit dem Anti-Sigmafaktor RsiG, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser Komplex durch c-di-GMP stabilisiert wird (Gallagher et al. 2020). Die Interaktion der beiden Proteine wurde unter anderem mittels Co-Expression und Co-Elution identifiziert (Gallagher et al. 2020). Der durch c-di-GMP vermittelte Komplex von RsiG und σ^{WhiG} lässt die Hypothese zu, dass dieser durch Interaktion mit einer spezifischen PDE aufgehoben werden könnte.

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob nach Co-Expression von *rmdB*, *whiG* und *rsiG*, eine Co-Elution der Proteine über spezifische Affinitätsmarker möglich ist. Dazu wurde das Gen *rmdB* in das Expressionsplasmid pGEX-6p1 kloniert (s. Tabelle 7), wodurch RmdB nach IPTG induzierter Expression N-terminal mit einem GST-Tag fusioniert wird. Nach Überexpression in *E. coli* kann GST-RmdB mittels Glutathion-Affinitätschromatografie gezielt isoliert werden (s. 4.7.1 und 4.7.5). Die Gene *whiG* und *rsiG* liegen im Expressionsplasmid pIJ10914 vor (s. Tabelle 7), wobei WhiG nach der Expression N-terminal mit einem His-Tag

fusioniert wird (Gallagher et al. 2020). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit einer gezielten Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie (s. 4.7.3). Beide Expressionsplasmide wurden in *E. coli* BL21 (DE3), pLysS, Rosetta (s. Tabelle 2) transformiert (s. 4.5.11), die Zellen in LB-Medium kultiviert (s. 4.3.1 und 4.4.1) und die gleichzeitige Expression aller drei Gene durch die Zugabe von IPTG induziert (s. 4.7.1). Nach erfolgter Zellernte und Zellaufschluss (s. 4.7.2) wurde das Zelllysate aliquotiert und sowohl eine spezifische Proteinreinigung mittels Glutathion-Affinitätschromatografie als auch mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie (s. 4.7.3 und 4.7.5) durchgeführt. Die Eluate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt (s. 4.7.13) und die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (s. 4.7.14). Um die Spezifität der Reinigungen zu validieren, wurden die Plasmide pGEX-*rmdB* und pIJ10914 einzeln in *E. coli* BL21 (DE3), pLysS, Rosetta überexprimiert und sowohl eine Proteinreinigung über Ni-NTA als auch über Glutathion-Sepharose durchgeführt. Die Ergebnisse der Co-Elutionsexperimente sind Abbildung 28 aufgeführt.

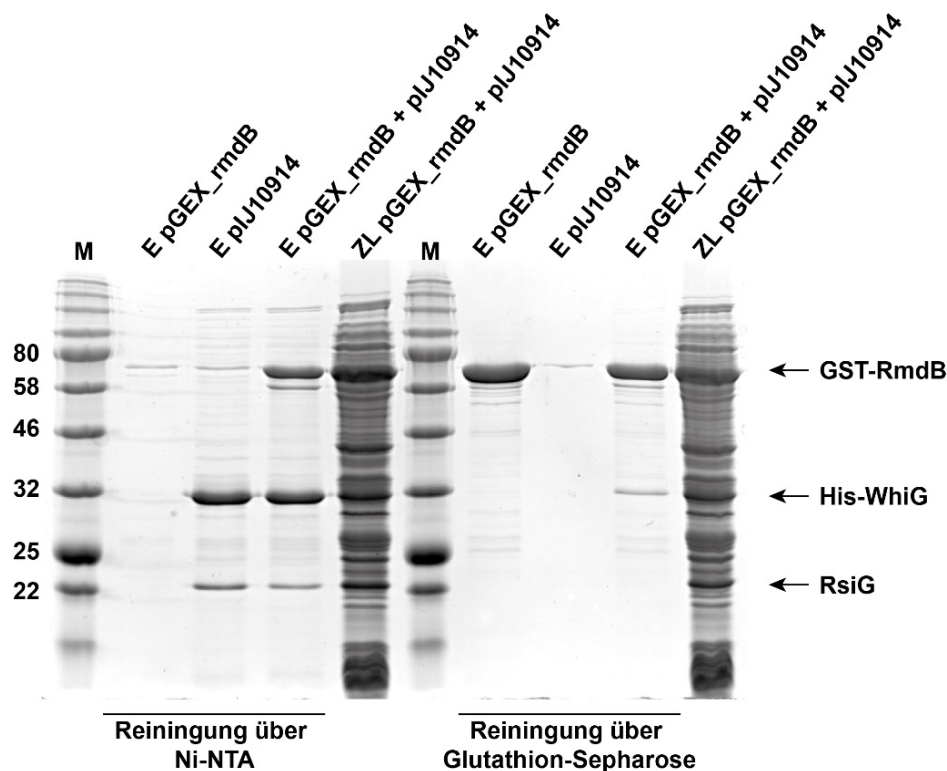


Abbildung 28: GST-RmdB und His-WhiG werden sowohl bei Reinigung über Ni-NTA als auch bei Reinigung über Glutathion-Sepharose co-eluiert. Einzeln lässt sich GST-RmdB nur über Glutathion-Sepharose und His-WhiG/RsiG nur über Ni-NTA reinigen. Coomassie gefärbtes PA-Gel nach SDS-PAGE von Eluates (E) und ggf. Zelllysate (ZL) aus der Reinigung von GST-RmdB und His-WhiG über Ni-NTA und Glutathion-Sepharose. Die Expressionsplasmide mit den kodierenden Genen von GST-RmdB (pGEX-*rmdB*), His-WhiG und RsiG (pIJ10914) wurden in BL21 (DE3), pLysS einzeln und zusammen transformiert und die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Die Reinigung über Ni-NTA und Glutathion-Sepharose erfolgte nach Aufschluss mittels Ultraschallbehandlung.

Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, werden GST-RmdB und His-WhiG sowohl bei Reinigung über Ni-NTA als auch über Glutathion-Sepharose co-eluiert. Bei der Reinigung über Ni-NTA wird zudem auch RsiG co-eluiert. Dies ist bei Reinigung desselben Zelllysats über Glutathion-Sepharose nicht zu erkennen. Die Kontrollen zeigen, dass die Affinitätschromatografien spezifisch sind und GST-RmdB nur mittels Glutathion-Sepharose und nicht mittels Ni-NTA sowie His-WhiG nur über Ni-NTA aber nicht über Glutathion-Sepharose isoliert werden kann. Bei der Reinigung von Zelllysat mit Exprimiertem pIJ10914 über Ni-NTA wird neben His-WhiG auch RsiG co-eluiert.

Aus den Ergebnissen dieser Co-Elutionsstudien kann abgeleitet werden, dass GST-RmdB mit His-WhiG interagieren kann. Eine spezifische Co-Elution von GST-RmdB und RsiG hingegen konnte nicht gezeigt werden. Weiterhin konnte das in (Gallagher et al. 2020) publizierte Ergebnis reproduziert werden, wohingegen RsiG mit His-WhiG co-eluiert wird.

2.5.2 RmdA und RmdB interagieren im *Bacterial-Two-Hybrid* Assay nicht mit WhiG oder RsiG

In 2.5.1 konnte gezeigt werden, dass GST-RmdB und His-WhiG nach Überexpression der jeweiligen Expressionsplasmide im selben Wirt mittels Affinitätschromatografie co-eluiert werden. Mittels *Bacterial-Two-Hybrid* (BTH) Assays (s. 4.7.21.1) sollte nun die Interaktion zwischen RmdB und WhiG verifiziert werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob RmdA mit WhiG oder RsiG interagieren kann. Der BTH-Assay baut auf der Wiederherstellung der Adenylatzyklase (CyaA)-Aktivität auf, welche über generiertes cAMP eine Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen wie Maltose aktivieren kann. Die kodierenden Genabschnitte der CyaA-Untereinheiten T18 bzw. T25 aus *Bordetella pertussis* liegen auf vier unterschiedlichen Plasmiden vor (s. Tabelle 3). In diese Plasmide wurden *rmdA* und *rmdB* kloniert (s. Tabelle 3), so dass nach Expression der Plasmide eine Fusion mit den T18 bzw. T25 Untereinheiten erzielt wurde. Die BTH-Konstrukte mit *rsiG* und *whiG* wurden von (Gallagher et al. 2020) bereitgestellt. Je nach Plasmid ist das Zielprotein nach Expression C-terminal (pKT25, pUT18C) oder N-terminal mit der T18- bzw. T25-Einheit (pUT18, pKNT25) fusioniert. Interagieren die zu testenden Proteine, kommt es zu einer interaktionsvermittelten räumlichen Nähe der T18- und T25-Einheiten und somit zur Ausbildung der vollständigen Adenylatzyklase und zur Synthese von cAMP.

Die generierten Plasmide wurden in *E. coli* AR388 Zellen (s. Tabelle 2) co-transformiert (s. 4.5.11 und 4.5.12), in welchen das Adenylatzyklase kodierende Gen *cyaA* deletiert ist. Der Transformationsansatz wurde zunächst auf LB-Agarplatten (s. 4.3.2), supplementiert mit X-Gal sowie Ampicillin und Kanamycin (s. 4.3.3) zur Selektion, ausplattiert. Zellsuspension von drei angewachsenen Kolonien wurde auf MacConkey-Agarplatten getropft (s. 4.3.2), die

Maltose und Antibiotika zur Selektion enthielten. Eine Interaktion der getesteten Fusionsproteine wurde durch Rotfärbung der Kolonien nach 2-3 Tagen angezeigt. Diese beruhte wiederum auf der interaktionsvermittelten Generierung von cAMP, welches zusammen mit dem Aktivatorprotein CAP (*catabolite activator protein*) einen Komplex bildet und die Expression von Genen für den fermentativen Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen (z.B. Maltose) induziert. Die Fermentationsprodukte führen zu einer Ansäuerung der Umgebung, welche durch einen Farbumschlag des im Medium vorhandenen pH-Indikators Neutralrot sichtbar wird. Als Positivkontrolle wurde pKT25-*zip* und pUT18C-*zip* in *E. coli* AR388 co-transfomiert, wobei die exprimierten ZIP-Domänen eine sehr starke Dimerisierung aufweisen. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* AR388+ pUT18 und pKT25 als Leervektoren mitgeführt.

Mittels des Konstrukts pUT18C-*rmdB-rsiG* sollte zudem untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen RmdB und WhiG nur in Kombination mit RsiG möglich ist. Dazu wurde das Gen *rsiG* samt Lac-Promotorsequenz hinter *rmdB* in pUT18C per Gibson-Assembly (s. 4.5.7) eingefügt. Als Kontrolle wurde die Kombination von pUT18C-*rsiG* und pKNT25-*whiG* mitgeführt, welche wie in (Gallagher et al. 2020) gezeigt, eindeutig interagieren. Die Ergebnisse der durchgeführten BTH-Assays sind in Abbildung 29 aufgeführt.

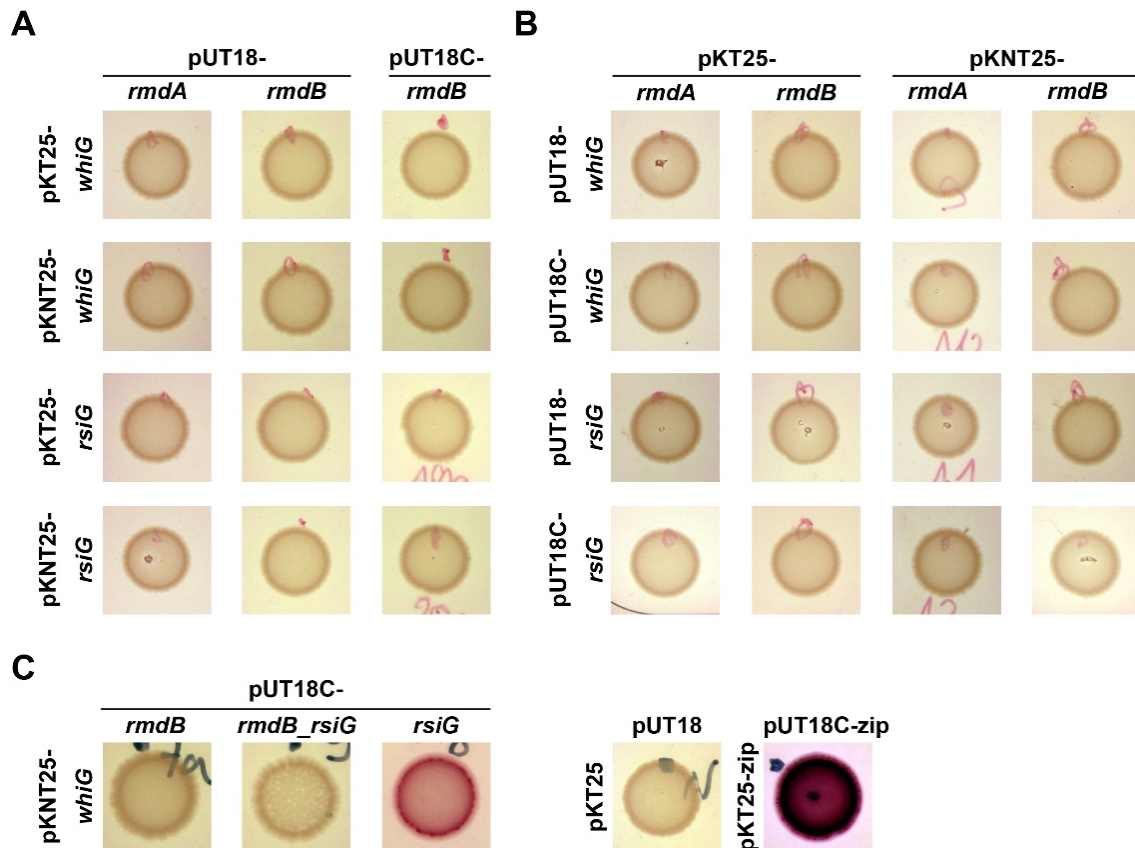


Abbildung 29: RmdA und RmdB zeigen im *Bacterial-Two-Hybrid* Assay keine Interaktion mit WhiG und RsiG. Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Wiederherstellung der Adenylatzyklase (CyaA)-Aktivität durch Fusion der Proteine mit CyaA-Untereinheiten T18 bzw. T25 aus *Bordetella pertussis*. Die Tropfcolonien wurden nach 48 Stunden Kultivierung auf MacConkey-Agar, supplementiert mit Maltose, fotografiert. **A:** Die Gene *rmdA* und *rmdB* auf pUT18 sowie *rmdB* auf pUT18C in Kombination mit *whiG* und *rsiG* auf pKT25 und pKNT25 zeigen keine Interaktion. **B:** Auch die Kombinationen von *rmdA* und *rmdB* auf pKT25 und pKNT25 mit *whiG* und *rsiG* auf pUT18 und pUT18C zeigen keine Interaktion. **C:** Die Kombination von pUT18C-*rmdB-rsiG* und pKNT25-*whiG* zeigt kein Anzeichen von Interaktion, wohingegen die mitgeführte Kombination von pUT18C-*rsiG* und pKNT25-*whiG* eine eindeutige Rotfärbung zeigt. Die Positivkontrolle (pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*) zeigt eine intensive Rotfärbung, während die Negativkontrolle (pUT18 –und pKT25 Leervektoren) keine Rotfärbung aufweist.

Wie aus Abbildung 29A-C hervorgeht, konnte zwischen RmdA, RmdB und WhiG sowie RsiG keine Interaktion festgestellt werden. Weder die einzelnen Kombinationen noch die Kombination von pUT18C-*rmdB-rsiG* und pKNT25-*whiG* zeigten eine Rotfärbung der Kolonien. Nur die mitgeführte Positivkontrolle (pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*) und die Kombination von pUT18C-*rsiG* und pKNT25-*whiG* zeigten im BTH-Assay eine eindeutige Rotfärbung.

Zusammenfassend konnte mittels der durchgeführten *Bacterial-Two-Hybrid* Assays keine Interaktion zwischen RmdA und WhiG sowie RsiG festgestellt werden. Auch die in den Co-Elutionsstudien (s. 2.5.1) festgestellte Interaktion zwischen RmdB und WhiG konnte mit diesem Experiment nicht bestätigt werden.

2.5.3 BldD, BldM, BldN, WhiG und RsiG werden bei Reinigung von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG über Affinitätschromatografie nicht co-eluiert

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von Interaktionspartnern stellte die Co-Elution von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG mittels FLAG-Affinitätschromatografie dar (s. 4.7.21.2). Dabei sollte eine mögliche Interaktion mit den Proteinen BldD, BldM, BldN, WhiG und RsiG in Zelllysaten aus *S. venezuelae* $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG untersucht werden.

Die Stämme $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG ermöglichen eine Aufreinigung von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG über den fusionierten FLAG-Affinitätsmarker mittels Anti-FLAG M2 Affinity Gelmatrix. Als Kontrolle wurde die Reinigung auch in *S. venezuelae* WT durchgeführt. Nach erfolgter Reinigung wurden die Eluate per SDS-PAGE (s. 4.7.13) proteingrößenspezifisch aufgetrennt und per Western Blot (s. 4.7.16) auf PVDF-Membran übertragen. Die Identifizierung möglicher Interaktionspartner erfolgte anschließend mittels Immunodetektion und spezifischer Antikörper (s. Tabelle 11). Dabei wurde neben den Eluaten auch das als Ausgangsprodukt eingesetzte Zelllysate als Kontrolle mitgeführt, welches die gesuchten Proteine unspezifisch enthalten sollte. Die Ergebnisse der durchgeführten Co-Elutionsansätze sind in Abbildung 30 aufgeführt. Weiterhin ist im Anhang in Abbildung 38 ein, per Silbernitrat angefärbtes Polyacrylamidgel aufgeführt, welches die aufgetrennten Eluate nach Reinigung zeigt und zur Kontrolle der Proteinausbeute mitgeführt wurde.

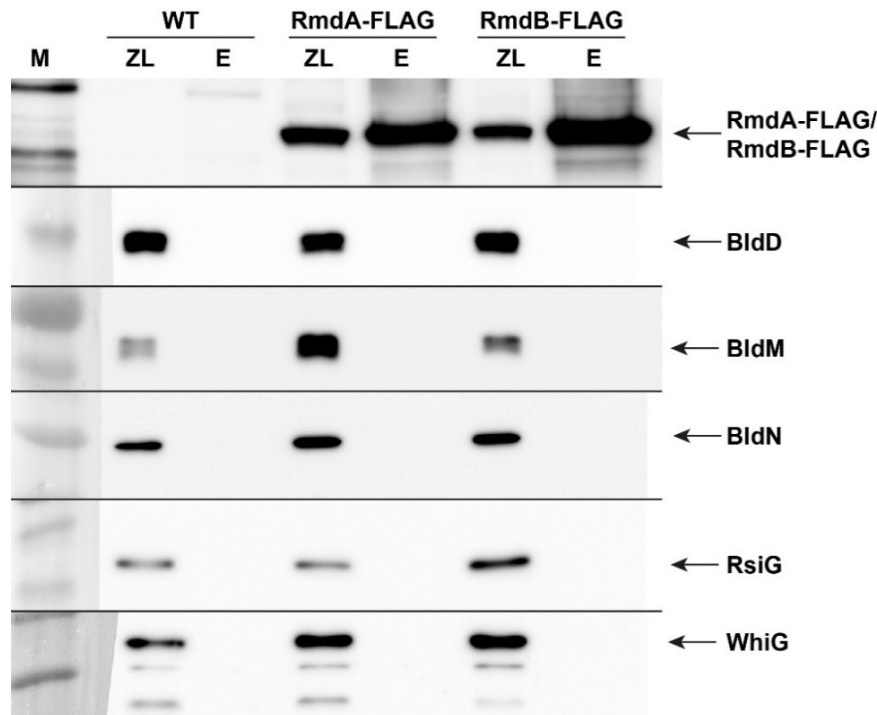


Abbildung 30: BldD, BldM, BldN, RsiG und WhiG werden nicht mit RmdA-FLAG und RmdB-FLAG co-eluiert. Immunodetektion von RmdA-FLAG, RmdB-FLAG sowie potenzieller Interaktionspartner mittels spezifischer Antikörper nach Reinigung von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG über Anti-FLAG M2 Affinity Matrix aus $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG Zelllysate. Dazu wurde Zelllysate und Eluat aus der Reinigung per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf PVDF-Membran übertragen. Wie ersichtlich wird, lassen sich RmdA-FLAG und RmdB-FLAG mittels Anti-FLAG M2 Affinity Matrix aus Zelllysate isolieren und sind in den Eluatfraktionen (E) detektierbar. BldD, BldM, BldN, RsiG und WhiG sind nur in den jeweiligen Zelllysaten (ZL), aber nicht in den Eluaten detektierbar. Die Zelllysate wurden in einer Konzentration von 10 μ g Gesamtprotein und die Eluate unverdünnt eingesetzt.

Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, ist RmdA-FLAG sowie RmdB-FLAG sowohl in den jeweiligen Zelllysate- als auch in den Eluatfraktionen von $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG mittels FLAG-spezifischen Antikörpern detektierbar. BldD, BldM, BldN, RsiG und WhiG konnten hingegen nur in den Zelllysatefraktionen aber nicht in den Eluatfraktionen von $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG nach FLAG-Affinitätschromatografie detektiert werden. In den Eluaten aus der Reinigung mit Zelllysate aus *S. venezuelae* WT ist wie erwartet kein RmdA-FLAG, RmdB-FLAG, BldD, BldM, BldN, RsiG oder WhiG detektierbar wohingegen im Zelllysate BldD, BldM, BldN, RsiG und WhiG detektiert werden konnten.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass BldD, BldM, BldN, RsiG und WhiG in diesem Experiment nicht mit RmdA-FLAG oder RmdB-FLAG co-eluiert werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Ausbeuten von RmdA-FLAG sowie RmdB-FLAG in der Reinigung aus $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG (s. Abbildung 38) gering ausfielen.

3 Diskussion

3.1 Die Gene *rmdA* und insbesondere *rmdB* sind in der Gattung *Streptomyces* hoch konserviert und kodieren für GG(D/E)F-EAL Tandemproteine, welche sich abseits der enzymaktivitätsvermittelnden Domänen grundlegend voneinander unterscheiden

Wie mit Pan-Genom Analysen gezeigt werden konnte, ist das RmdB kodierende Gen *rmdB* in 91 von 93 vollständig sequenzierten Streptomyceten Genomen konserviert (Al-Bassam et al. 2018). Neben den für Diguanylatzyklasen kodierenden Genen *cdgA* und *cdgB*, welche in allen 93 Stämmen identifiziert werden konnten, ist RmdB damit eines der häufigsten c-di-GMP metabolisierenden Proteine und die häufigste Phosphodiesterase in der Gattung *Streptomyces* (Al-Bassam et al. 2018). Eine Ausnahme stellt *S. violaceoruber* S21 dar, in dessen Genom *rmdA* das einzige EAL-kodierende Gen darstellt (Al-Bassam et al. 2018). Das für RmdA kodierende Gen *rmdA* konnte in 82 *Streptomyces* Stämmen identifiziert werden und co-existiert in 81 Stämmen zusammen mit *rmdB* (Al-Bassam et al. 2018). Dieser hohe Konservierungsgrad der für RmdA und insbesondere für RmdB kodierenden Gene unterstreicht deren Bedeutung als c-di-GMP metabolisierende Proteine in der Gattung *Streptomyces*.

Weiterhin konnte in den Pan-Genom Analysen gezeigt werden, dass in allen *Streptomyces* Stämmen in welchen *rmdA* identifiziert werden konnte, das Gen *vnz33670* stromaufwärts von *rmdA* lokalisiert ist (Al-Bassam et al. 2018). In *S. venezuelae* bilden die beiden Gene ein Operon, wobei die Promotorregion stromaufwärts von *vnz33670* liegt. Das durch *vnz33670* kodierte Protein weist eine hohe prozentuale Identität mit einer S-adenosyl-L-methionine (SAM) abhängigen Methyltransferase aus *Kitasatospora albolonga* auf (s. Abbildung 32). In *S. venezuelae* ist die Funktion von *vnz33670* ungeklärt und mögliche Interaktionen mit RmdA sollten in weiteren Experimenten untersucht werden.

Neben den GG(D/E)F- und EAL Domänen unterscheiden sich RmdA und RmdB aus *S. venezuelae* deutlich voneinander. Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, weist RmdA N-terminal einen 162 Aminosäuren langen Bereich auf, wobei *in silico* Analysen der Aminosäurestruktur und die Zusammensetzung der Aminosäuren keine Erkenntnisse auf dessen Funktion schließen ließen. Bei der Produktion von RmdA und Varianten dieses Proteins in *E. coli*, musste dieser Bereich zwingend auf Genebene entfernt werden (s. Abbildung 15), da die Proteine sonst unlöslich waren und nicht aufgereinigt werden konnten. Auch in (Hull et al. 2012) wurde beschrieben, dass dieser Bereich bei der transgenen Produktion von RmdA in *E. coli* entfernt werden musste. Es wird vermutet, dass dieser Bereich *in vivo* für die Interaktion mit anderen Proteinen dient, welche möglicherweise an der Membran lokalisiert sind.

Diese Hypothese wird durch Experimente zur Lokalisierung von RmdA-FLAG gestützt, in welchen Zelllysate aus *S. venezuelae* $\Delta rmdA::rmdA\text{-FLAG}$ in zytosolischen Überstand und Membranfraktion getrennt wurde. Mittels spezifischer Anti-FLAG Antikörper konnte RmdA-FLAG dabei sowohl in der Membranfraktion als auch in der zytosolischen Fraktion identifiziert werden (s. Abbildung 13). Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Lokalisierung in der Membranfraktion auf Denaturierungsereignisse während des Aufschlusses oder die verwendeten Pufferbedingungen zurückzuführen ist.

An den N-terminalen Bereich schließt in RmdA eine PAS- und PAC-Domäne an. Wie in (Hull et al. 2012) beschrieben, konnte die PAS-Domäne, des RmdA Homologes aus *S. coelicolor* Häm binden und in Folge dessen eine Veränderung im Absorptionsspektrum durch Oxidation bzw. Reduktion festgestellt werden. Auch bei Supplementierung mit Sauerstoff (O₂) und Kohlenmonoxid (CO) war diese Veränderung im Absorptionsspektrum feststellbar (Hull et al. 2012). Der Redox-Zustand der PAS-Domäne von RmdA hatte jedoch bei anschließenden *in vitro* Enzymaktivitätsexperimenten keinen Einfluss auf die festgestellte PDE-Aktivität (Hull et al. 2012).

RmdB weist N-terminal seiner GG(D/E)F- und EAL-Domäne sechs Transmembrandomänen auf (s. Abbildung 4), welche wie experimentell in $\Delta rmdB::rmdB\text{-FLAG}$ gezeigt, RmdB-FLAG an die Zellmembran lokalisieren (s. Abbildung 13). Neben den Transmembrandomänen, welche eine spezifische Lokalisierung ermöglichen und der GG(D/E)F- und EAL Domäne, weist RmdB keine weiteren Bereiche auf, die mit einer bestimmten Funktion assoziiert werden könnten.

3.2 Die Gene *rmdA* und *rmdB* werden über den gesamten Entwicklungszyklus exprimiert, wobei die Expression beider Gene nicht direkt von BldD reguliert wird und *rmdB* kein TTA-Kodon aufweist

Die Stämme $\Delta rmdA::rmdA\text{-FLAG}$ und $\Delta rmdB::rmdB\text{-FLAG}$ konnten auch für die Ermittlung des Expressionsmusters von *rmdA* und *rmdB* herangezogen, da *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren stehen. Wie aus den Immunodetektions-Experimenten in Abbildung 12 hervorgeht, werden *rmdA*-FLAG und *rmdB*-FLAG im Zeitraum 8-20 Stunden in Flüssigmedium exprimiert. Dabei wird ersichtlich, dass *rmdB*-FLAG im untersuchten Zeitraum zunehmend und stärker exprimiert wird als *rmdA*-FLAG, welches konstant exprimiert wird. Diese Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen aus Microarray-Experimenten, in welchen *rmdA* und *rmdB* unter den zehn in *S. venezuelae* für potentiell c-di-GMP metabolisierenden kodierenden Genen am stärksten exprimiert werden (Al-Bassam et al. 2018).

Fusionen von *rmdA* und *rmdB* mit *mCherry* (s. Abbildung 14) deuten zudem darauf hin, dass RmdB-mCherry zu Zeitpunkt 16 Stunden spezifisch innerhalb der Hyphen lokalisiert wird. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen eine Akkumulation des Fluoreszenzsignals festgestellt. Um dieses Lokalisierungsmuster von RmdB-mCherry genauer charakterisieren zu können, sollte in zukünftigen Experimenten spezifische Membran- oder DNA-Färbung durchgeführt werden. Eine spezifische Lokalisierung von RmdA-mCherry konnte nicht detektiert werden. Im Vergleich mit den Fluoreszenzintensitäten von RmdB-mCherry waren diese in Proben aus $\Delta rmdA::rmdA$ -mCherry zu allen Zeitpunkten deutlich schwächer ausgeprägt und nur ein diffuses Signal detektierbar. Dieser Umstand wird auf die geringere Expression von *rmdA*-mCherry zurückgeführt und unterstreicht das Ergebnis des beobachteten Expressionsmusters (s. Abbildung 12).

Die transkriptionelle Regulation von *rmdA* aus *S. venezuelae* ist bislang nicht geklärt. In ChIP-Seq Analysen konnten gezeigt werden, dass *rmdA* und *rmdB* keine direkten BldD-Zielgene sind (Tschowri et al. 2014). Dieses Ergebnis konnte mittels durchgeführter EMSA Experimente (s. Abbildung 19) bestätigt werden. Auch in Anwesenheit von hohen c-di-GMP Konzentrationen ist keine Bindung von His-BldD an die Promotorregionen von *rmdA* bzw. *rmdB* zu erkennen. Somit wird die Expression von *rmdA* und *rmdB* nicht direkt von BldD reguliert.

Für *rmdB* aus *S. venezuelae* konnte mittels ChIP-Seq Analysen gezeigt werden, dass der Transkriptionsregulator MtrA an die Promotorregion binden kann (Som et al. 2017). Das Regulon von MtrA umfasst unter anderem einige BldD-Zielgene wie *bldM*, *bldN* und *whiG* und aktiviert zusammen mit MtrB als Zweikomponentensystem die Produktion von Chloramphenicol in *S. venezuelae* (Som et al. 2017). Inwiefern MtrA die Expression von *rmdB* aktiviert oder reprimiert muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Weiterhin konnte für die *rmdB* Homologe aus *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* gezeigt werden, dass diese ein TTA-Kodon in ihrer Gensequenz aufweisen (Hull et al. 2012; Makitrynsky et al. 2020). Entsprechend ist die Expression von *rmdB* in diesen Stämmen von tRNA-*bldA* abhängig, welche die einzige UAA-tRNA in *Streptomyces* darstellt (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011). Die Expression von *bldA* wird wiederum von BldH aktiviert, mit welchem tRNA-*bldA* eine positive Rückkopplungsschleife ausbildet da auch *bldH* ein TTA-Kodon aufweist (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011). Die Expression von *bldA* als auch *bldH* wird von BldD reprimiert, wodurch die Expression von *rmdB* in *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* wiederum indirekt von BldD abhängig ist (den Hengst et al. 2010). Mittels Sequenzvergleichen von *rmdB* aus *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* konnte gezeigt werden, dass *rmdB* aus *S. venezuelae* kein TTA-Kodon aufweist (s. Abbildung 5). Anderes als für *rmdB* aus *S. coelicolor* oder *S.*

ghanaensis lässt sich somit eine Regulation durch die *bldA* kodierte tRNA^{Leu}_{UAA} *bldA* ausschließen.

3.3 Die Proteine RmdA und RmdB sind für die charakteristische Entwicklung von *S. venezuelae* essenziell und eine Deletion der Gene führt zu einer signifikanten Entwicklungsverzögerung

Während Wachstumsexperimente hinsichtlich der Zunahme der optischen Dichte (s. Abbildung 10) zwischen *S. venezuelae* WT und $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ keine Unterschiede erkennen ließen, konnten bei Kultivierung der Deletionsmutanten $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ als Makrokolonien ausgeprägte Phänotypen beobachtet werden (s. Abbildung 6A). Die chromosomale Deletion der Gene *rmdA* und *rmdB* führt in *S. venezuelae* zu einer deutlichen Verzögerung der Entwicklung. Dabei ähneln sich die Phänotypen von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$, sie sind jedoch nicht identisch. Wie in Abbildung 6A gezeigt, verzögert die Deletion von *rmdA* die Entwicklung im Vergleich zu *S. venezuelae* WT um ca. 1 Tag. Im Vergleich dazu führt die Deletion von *rmdB* zu einer noch ausgeprägteren Verzögerung von ca. 2 Tagen. Beide Deletionsmutanten durchlaufen jedoch, mit der oben genannten Verzögerung, alle charakteristischen Entwicklungsschritte von *S. venezuelae*. Der ausgeprägte Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ lässt sich, wie in Abbildung 6B gezeigt, nach Expression von *rmdA*- und *rmdB*-Versionen, welche N-terminal einen FLAG-Affinitätsmarker aufweisen, vollständig komplementieren. Wie in Abbildung 7 dargestellt, ist die durch die Deletion von *rmdA* und *rmdB* hervorgerufene Verzögerung der Entwicklung auch in MYM-Flüssigmedium zu beobachten. Dabei ist jedoch im Vergleich zur Kultivierung auf Festmedium (Abbildung 6A) zwischen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ kein Unterschied in der Entwicklungsgeschwindigkeit zu erkennen und beide Deletionsstämme sind gleich stark in ihrer Entwicklung verzögert. Auch in Flüssigmedium kultiviert durchlaufen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ alle charakteristischen Entwicklungsschritte.

Aus den Ergebnissen der phänotypischen Untersuchungen mit den Deletionsstämmen $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ lässt sich ableiten, dass RmdA und RmdB eine wichtige Rolle für die charakteristische Entwicklung von *S. venezuelae* einnehmen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der Charakterisierung der RmdA und RmdB Homologen aus *S. coelicolor* und *S. ghanaensis* gemacht. In *S. coelicolor* führten einzelne Deletionen von *rmdA* und *rmdB* zu einer geringen Verzögerung der Entwicklung und nur bei gleichzeitiger Deletion beider Gene konnte eine starke Verzögerung beobachtet werden (Hull et al. 2012). In *S. ghanaensis* bewirkt die Deletion von *rmdB_{gh}* eine deutliche Verzögerung der Entwicklung, wobei nach 5 Tagen Wachstum auf Festmedium keine Sporen detektiert werden konnten (Makitrynsky et al. 2020).

Die Phänotypen von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ aus *S. venezuelae* ähneln dem verzögerten Wachstum, der bei einer Überexpression von *cdgB* aus *S. coelicolor* in *S. venezuelae* beschrieben wurde (Tschowri et al. 2014). Das Gen *cdgB* kodiert für die Diguanylatzyklase CdgB, wobei die in diesem Experiment beobachtete Verzögerung auf eine potenziell erhöhte zelluläre c-di-GMP Konzentration zurückgeführt wurde (Tschowri et al. 2014). Im Vergleich dazu führte die Überexpression von *pdeH* aus *E. coli*, welches für die Phosphodiesterase PdeH kodiert, zu einem Hypersporulations-Phänotyp (Tschowri et al. 2014). Dieser äußerte sich dadurch, dass die Ausbildung von Lufthyphen übersprungen wird und sich vegetative Hyphen direkt in Sporen umwandeln. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch bei einer Deletion von *bldD* und dem für die Diguanylatzyklase CdgC kodierenden Gen *cdgC* in *S. venezuelae* beobachtet (Tschowri et al. 2014; Al-Bassam et al. 2018). Aus diesen Ergebnissen wird abgeleitet, dass erhöhte c-di-GMP Konzentrationen die Entwicklung von Streptomyceten verlangsamen und andererseits niedrige c-di-GMP Konzentrationen zu einer beschleunigten Entwicklung führen. Die Integration von c-di-GMP erfolgt dabei durch die beiden c-di-GMP Effektoren, den Transkriptionsregulator BldD und den Anti-Sigmafaktor RsiG (Tschowri et al. 2014; Gallagher et al. 2020).

Die Hypothese, dass BldD in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ länger aktiv als Transkriptionsrepressor fungieren kann, konnte durch Experimente bekräftigt werden, in welchen der Expressionszeitpunkt von *ftsZ* in *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ verglichen wurde (s. Abbildung 8 und Abbildung 9). Zum Zeitpunkt der Septierung, also beim Übergang in die Sporulationsphase, wird das Gen *ftsZ* stark exprimiert und FtsZ bildet kontraktile Ringe, welche in den Hyphen ein leiterartiges Muster ergeben und die zukünftigen Sporulations-Septa darstellen (Flardh et al. 2000; Haeusser and Margolin 2016). Entsprechend eignet sich FtsZ als Marker zur Beurteilung und zum Vergleich des Entwicklungsstandes von Streptomyceten. Die Expression von pSS05 in *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$, ermöglicht es, den Zeitpunkt der Expression von *ftsZ-ypet* und somit den Eintritt in die Sporulationsphase mittels Fluoreszenzmikroskopie und Immunodetektion festzustellen (Schlimpert et al. 2017). Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, konnte die festgestellte Verzögerung der Entwicklung von *S. venezuelae* $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ (s. Abbildung 6A und Abbildung 7) mittels Expressionsmuster von *ftsZ-ypet* bestätigt werden. Die Expression von *ftsZ-ypet* erfolgt in $\Delta rmdA+$ *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* deutlich später als in WT+ *ftsZ-ypet* und in $\Delta rmdB+$ *ftsZ-ypet* ist zum Zeitpunkt 16 Stunden das spezifische leiterartige Lokalisierungsmuster von FtsZ-YPet zu erkennen. In WT+ *ftsZ-ypet* kann das durch die Polymerisierung von FtsZ-YPet generierte Leitemuster bereits nach 14 Stunden identifiziert werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Expression von *ftsZ-ypet* auch im WT+ *ftsZ-ypet* zu einer Verzögerung der Entwicklung führt, was aus den vergleichenden Phasenkontrastaufnahmen von *S. venezuelae*

WT und WT+ *ftsZ-ypet* hervorgeht. Die verzögerte Expression von *ftsZ-ypet* in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* wird auch durch die in Abbildung 9 aufgeführte Immunodetektion von FtsZ-YPet bestätigt. Hierbei konnte über die Intensitäten der detektierten FtsZ-YPet Banden im Vergleich zu WT+ *ftsZ-ypet* eine verringerte *ftsZ-ypet* Expression von 64% in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und 44% in $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* zum Zeitpunkt 12 Stunden festgestellt werden.

c-di-GMP-Effektor BldD bindet, wie durch *Chip-Seq* Analysen ermittelt, direkt an der Promotorsequenz von *ftsZ* und reprimiert vermutlich dessen Expression und damit einen essenziellen Faktor für die Einleitung der Sporulation (Tschowri et al. 2014). Neben BldD bindet auch Sigmafaktor σ^{WhiG} an der Promotorsequenz von *ftsZ* (Flardh et al. 2000). Die verzögerte Expression von *ftsZ-ypet* in $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* könnte demnach durch erhöhte c-di-GMP Konzentrationen ausgelöst werden, wodurch BldD länger aktiv als Repressor agieren kann und σ^{WhiG} durch Anti-Sigmafaktor und c-di-GMP Effektorprotein RsiG gebunden wird.

3.4 RmdA und RmdB zeigen *in vitro* Phosphodiesteraseaktivität und die *in vivo* Funktion von RmdA und RmdB beruht auf der Integrität des jeweiligen EAL-Motivs

Die in 3.3 aufgestellte Hypothese, dass die verzögerte Entwicklung von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ auf veränderten c-di-GMP Konzentrationen beruht, setzt voraus, dass RmdA und RmdB enzymatisch aktiv sind und c-di-GMP metabolisieren können. Die c-di-GMP metabolisierende Aktivität von DGCs und EAL-PDEs ist durch die Integrität der GG(DE)F- bzw. EAL-Domäne und insbesondere durch das Vorhandensein eines intakten GGDEF- bzw. EAL-Motivs abhängig (Pei and Grishin 2001; Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005; Linder 2006). Wie in Abbildung 4 gezeigt, ist dies sowohl bei RmdA und RmdB gegeben. RmdA und RmdB sind sogenannte Tandem-Proteine und weisen sowohl eine GG(D/E)F- als auch eine EAL-Domäne auf und sind somit potenziell in der Lage c-di-GMP sowohl zu synthetisieren als auch zu hydrolysieren. Ob und welche enzymatische Funktion RmdA und RmdB aus *S. venezuelae* aufweisen, war bislang nicht experimentell untersucht worden. Für die enzymatische Charakterisierung von RmdA und RmdB wurden transgen produzierte Proteinvarianten (s. Abbildung 15) in *in vitro* Enzymassays eingesetzt.

Wie aus den durchgeführten PDE-Assays (s. Abbildung 16A) hervorgeht, weist RmdB eindeutig PDE-Aktivität auf und hydrolysiert [32 P]c-di-GMP zu linearem [32 P]pGpG. Wie in Abbildung 17 gezeigt, läuft die Hydrolyse von [32 P]c-di-GMP durch RmdB in Gegenwart von Mn^{2+} als Co-Faktor deutlich effizienter ab als in Gegenwart von Mg^{2+} .

In durchgeführten DGC-Assays (s. Abbildung 16B) konnte hingegen keine Aktivität festgestellt werden, was vermuten lässt, dass die GG(D/E)F-Domäne von RmdB zumindest unter den

getesteten Umständen inaktiv ist. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der *in vitro* Enzymassays mit RmdB aus *S. coelicolor*, in welchen RmdB als monofunktionale PDE charakterisiert wurde (Hull et al. 2012). Mittels *UV-Crosslink* Experimenten (s. Abbildung 18A und B) konnte jedoch gezeigt werden, dass RmdB *in vitro* neben [³²P]c-di-GMP auch [³²P]GTP spezifisch binden kann. Die Bindung von [³²P]GTP durch RmdB fällt jedoch deutlich schwächer aus als die Bindung von [³²P]c-di-GMP. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass RmdB unter bestimmten Umständen auch DGC-Aktivität aufweisen kann. Außerdem wurden bei allen eingesetzten Varianten von RmdB die Transmembrandomänen entfernt, wodurch RmdB nicht mehr in der Lage ist in der Membran verankert zu werden. Möglicherweise wird dadurch auch eine Dimerisierung verhindert, welche für eine DGC-Aktivität essenziell ist (Ross et al. 1987; Paul et al. 2007).

Auch RmdA weist eindeutig PDE-Aktivität auf, wobei, wie aus Abbildung 16A hervorgeht, [³²P]c-di-GMP zu [³²P]GMP hydrolysiert wird und [³²P]pGpG als Intermediärprodukt identifiziert werden kann. Die Zugabe von unmarkiertem GTP im Überschuss führt zu einer Inhibierung der Hydrolyse von [³²P]pGpG zu [³²P]GMP (s. Abbildung 16A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die GG(D/E)F-Domäne von RmdA GTP binden kann und diese Bindung die Aktivität der EAL-Domäne beeinträchtigt. Tatsächlich ist bei Inkubation von RmdA mit [³²P]GTP (s. Abbildung 16B) ein Reaktionsprodukt detektierbar, welches als Intermediat einer möglichen c-di-GMP Synthese gedeutet werden kann. Um zu verhindern, dass das Syntheseprodukt der GG(D/E)F-Domäne von der PDE-Aktivität der EAL-Domäne hydrolysiert wird, wurde eine Ansatz mit einem Überschuss an unmarkiertem c-di-GMP supplementiert. Wie aus Abbildung 16B hervorgeht, kann nach Konkurrenz der PDE-Aktivität von RmdA mit unmarkiertem c-di-GMP generiertes [³²P]c-di-GMP detektiert werden. Neben [³²P]c-di-GMP ist auch [³²P]pGpG detektierbar, was vermutlich auf verbliebene Hydrolyse-Aktivität der EAL-Domäne zurückzuführen ist. Mittels einer Variante von RmdA, in welcher das GGDEF-Motiv in GGAAF verändert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Diguanylatzyklaseaktivität von RmdA von einem intakten GGDEF-Motiv abhängig ist.

Die Charakterisierung der enzymatischen Funktion von RmdA *in vitro* zeigt, dass RmdA, im Gegensatz zu RmdB, als bifunktionales Enzym fungieren kann und neben der Hydrolyse von c-di-GMP auch in der Lage ist, dieses aus GTP zu generieren. Die erzielten Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die PDE-Aktivität von RmdA überwiegt, da c-di-GMP direkt durch die EAL-Domäne hydrolysiert wird. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass unter physiologischen Bedingungen und bestimmten Umständen die DGC-Aktivität von RmdA dominiert. Wie in 1.3.2 beschrieben, sind bifunktionale Tandem-Proteine selten, aber nicht unüblich. MSDGC-1 aus *Mycobacterium smegmatis* wurde beispielsweise als bifunktionales Tandem-Protein identifiziert, wobei die jeweiligen Domänen alleine keine enzymatische

Aktivität aufwiesen (Bharati et al. 2012). Auch das GGDEF-EAL Tandem-Protein PdeR aus *E. coli* weist neben PDE Aktivität unter bestimmten Bedingungen auch geringe DGC Aktivität auf (Lindenberg et al. 2013).

Die in Abbildung 16A gezeigte Hydrolyse von [32 P]c-di-GMP zu [32 P]pGpG durch RmdA und RmdB ist für EAL-Phosphodiesterasen charakteristisch. Dagegen ist die weitere Hydrolyse von [32 P]pGpG zu [32 P]GMP, welche bei PDE-Assays mit RmdA beobachtet werden konnte, für HD-GYP-PDEs typisch (Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005; Bellini et al. 2014). Mit PdeH, PdeL und PdeR sind jedoch auch weitere PDEs bekannt, welche [32 P]pGpG weiter zu [32 P]GMP hydrolysieren, wobei beschrieben wurde, dass dieser zweite Hydrolyseschritt deutlich langsamer abläuft und deshalb dessen physiologische Relevanz *in vivo* angezweifelt wird (Schmidt, Ryjenkov, and Gomelsky 2005; Lindenberg et al. 2013).

Die enzymatischen Aktivitäten von RmdA und RmdB konnten erfolgreich durch *in vitro* Enzymassays charakterisiert werden. Dass diese Eigenschaften auch physiologisch relevant sind, konnte durch Inaktivierung der Aktivität vermittelnden GGDEF- und EAL-Motive von RmdA und RmdB *in vivo* gezeigt werden (s. Abbildung 11). In den generierten Stämmen *rmdA*^{AAA} und *rmdB*^{AAA} wurden die kodierenden Sequenzbereiche des EAL-Motivs durch chromosomale Mutationen so verändert, dass diese nach Expression ein AAA-Motiv ergeben. Auf dieselbe Weise wurde im Stamm *rmdA*^{ALLEF} das GGDEF-Motiv von RmdA in ALLEF mutiert. Da die chromosomale Mutation der GGDEF kodierenden Sequenz von RmdB fehlschlug, wurde in Δ *rmdB* p3xFLAG*rmdB*^{GGAFF} exprimiert, welche RmdB mit einem GGAFF-Motiv generiert. Wie aus Abbildung 11 geschlossen werden kann, ist das EAL-Motiv sowohl in RmdA als auch in RmdB für deren Funktion in *S. venezuelae* essenziell. Die Mutation der kodierenden Sequenzbereiche des EAL-Motivs zu AAA führt in *rmdA*^{AAA} sowie *rmdB*^{AAA} zu einem vergleichbaren Phänotyp, der auch bei Deletion der Gene *rmdA* und *rmdB* beobachtet werden kann. Im Gegensatz dazu hat die Mutation des GGDEF-Motivs von RmdA keine Auswirkungen auf die Entwicklungsgeschwindigkeit und in Δ *rmdB*+ p3xFLAG*rmdB*^{GGAFF} wird der Deletionsphänotyp vollständig komplementiert.

Die phänotypischen Untersuchungen der chromosomal mutierten Stämme *rmdA*^{AAA} sowie *rmdB*^{AAA} unterstreichen, dass die PDE-vermittelnden EAL-Motive von RmdA und RmdB für eine stabile Entwicklung von *S. venezuelae* essenziell sind. Zusammen mit der Erkenntnis, dass beide Proteine *in vitro* PDE-Aktivität aufweisen, bekräftigt dieses Ergebnis die Schlussfolgerung, dass RmdA und RmdB für die Hydrolyse von c-di-GMP in *S. venezuelae* maßgeblich verantwortlich sind.

3.4.1 RmdB fungiert als *Master-PDE* bei der Degradierung von c-di-GMP in *S. venezuelae*

BldD und RsiG sind essenzielle Entwicklungsregulatoren in *S. venezuelae* (Tschowri et al. 2014; Gallagher et al. 2020). Als c-di-GMP-Effektorproteine benötigen beide c-di-GMP um ihre Funktion als Transkriptionsrepressor bzw. Anti-Sigmafaktor von σ^{WhiG} auszuüben (Tschowri et al. 2014; Gallagher et al. 2020). Entsprechend ist die Verfügbarkeit und Regulation von c-di-GMP essenziell für die Entwicklungsregulation von Streptomyeten. Abgeleitet von dieser Erkenntnis wurde vermutet, dass die zelluläre c-di-GMP Konzentration zum Einsetzen der reproduktiven Wachstumsphase sinken müsste und somit die Funktionen von BldD und RsiG geschwächt würden.

Wie in 3.4 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die PDE-vermittelnden EAL-Motive von RmdA und RmdB für deren Funktion essenziell sind und beide Proteine *in vitro* PDE-Aktivität aufweisen. Um zu ermitteln inwiefern RmdA und RmdB bei der Regulation der globalen zellulären c-di-GMP Konzentration beteiligt sind, wurden Nukleotidextraktionen in *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zu unterschiedlichen Zeitpunkten und sowohl in Flüssigmedium als auch auf Festmedium kultiviert, durchgeführt. Wie aus den Ergebnissen in Abbildung 20A hervorgeht, sinkt die c-di-GMP Konzentration in *S. venezuelae* WT, kultiviert in Flüssigmedium, wie vermutet zum Einsetzen der reproduktiven Wachstumsphase (12-14 Stunden). Anschließend steigt diese jedoch wieder stark an und erreicht nach 20 Stunden den höchsten Wert. Dieser Trend lässt vermuten, dass sich c-di-GMP während der vegetativen und der späten Sporulationsphase akkumuliert, während es spezifisch beim Übergang von der vegetativen Wachstumsphase zur reproduktiven Wachstumsphase abgebaut wird oder zu diesem Zeitpunkt die Produktion eingestellt wird.

Die Deletion von *rmdA* und insbesondere von *rmdB* wirkt sich auf die globalen zellulären c-di-GMP Konzentrationen aus (s. Abbildung 20A und Abbildung 20B). Die Deletion von *rmdA* äußerte sich sowohl bei Kultivierung in Flüssigmedium als auch bei Wachstum auf Festmedium durch erhöhte c-di-GMP Konzentrationen während der frühen Zeitpunkte. Mit fortschreitender Entwicklung gleichen sich die c-di-GMP Konzentrationen von $\Delta rmdA$ mit denen von *S. venezuelae* WT an. In allen analysierten Proben, welche aus $\Delta rmdB$ Flüssigkultur entnommen wurden, war im Vergleich zum WT eine erhöhte c-di-GMP Konzentration detektierbar. Der Konzentrationsunterschied zwischen $\Delta rmdB$ und *S. venezuelae* WT wurde jedoch mit fortschreitender Zeit immer geringer. Auch kultiviert auf Festmedium waren in $\Delta rmdB$ zu den frühen Zeitpunkten erhöhte c-di-GMP Konzentrationen feststellbar.

Dieses Resultat unterscheidet sich von den Untersuchungen in *S. coelicolor*, bei welchen gezeigt wurde, dass nur die gleichzeitige Deletion von *rmdA* und *rmdB* eine Erhöhung der globalen zellulären c-di-GMP Konzentration bewirkt (Hull et al. 2012). In *S. ghanaensis* wurde hingegen festgestellt, dass die Deletion von *rmdB* zu gesteigerten c-di-GMP Konzentrationen über den gesamten untersuchten Zeitraum führt (Makitynsky et al. 2020). RmdB scheint zumindest in *S. venezuelae* und in *S. ghanaensis* als *Master-PDE* für den Abbau von c-di-GMP verantwortlich zu sein. Dabei korreliert die starke Aktivität von RmdB mit dem Expressionsmuster von *rmdB*-FLAG (s. Abbildung 12), welches über den gesamten Entwicklungszyklus stark exprimiert wird. Der Einfluss von RmdA auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration beschränkt sich auf den Zeitraum bis zum charakteristischen Eintritt in die regenerative Wachstumsphase.

Wie Untersuchungen in *E. coli* gezeigt haben, findet neben einer globalen Regulation auch auf lokaler Ebene eine Regulation der c-di-GMP Konzentration statt (Sarenko et al. 2017; Richter et al. 2020). Die Integration von c-di-GMP in die Regulation der Biofilmbildung ist hierbei hoch komplex und wird durch Interaktion verschiedener PDE/DGC Paare realisiert, welche untereinander in einer Art Supermodul verknüpft sind (Sarenko et al. 2017; Richter et al. 2020). Dennoch existiert auch hier mit PdeH eine *Master-PDE*, welche wie RmdB für die Regulation der globalen zellulären c-di-GMP Konzentration verantwortlich ist (Sarenko et al. 2017). Das sogenannte *Fountain-Modell* betrachtet PdeH als eine Art Drainage für c-di-GMP, welche während der frühen Wachstumsphase aktiv ist und den globalen zellulären c-di-GMP Spiegel im zweistelligen Nanomolarbereich stabilisiert. Hierdurch können DGCs den c-di-GMP Spiegel lokal spezifisch erhöhen und somit assoziierte Effektorsysteme aktivieren (Sarenko et al. 2017; Richter et al. 2020).

3.5 Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* hat Einfluss auf das Transkriptom von *S. venezuelae*

RmdA und RmdB fungieren als aktive PDEs in *S. venezuelae* und die Deletion von *rmdA* und *rmdB* hat zumindest zeitweise einen Effekt auf die globale zelluläre c-di-GMP Konzentration. Die Abwesenheit beider Gene führt zu ausgeprägten Phänotypen, welche die Annahme zulassen, dass die Deletion von *rmdA* und *rmdB* auch Auswirkungen auf die globale Genregulation von *S. venezuelae* hat. Diese Annahme konnte mittels einer vergleichenden Transkriptomanalyse (s. 2.4.1), basierend auf isolierter Gesamt-RNA aus *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$, bestätigt werden. Die Gesamt-RNA wurde aus Makrokolonien isoliert, welche für 30 Stunden kultiviert wurden. Zu diesem Zeitpunkt sind die phänotypischen Unterschiede zwischen *S. venezuelae* WT und den Deletionsmutanten deutlich ausgeprägt (s. Abbildung 6A) und es konnten sowohl in $\Delta rmdA$ als auch in $\Delta rmdB$ erhöhte c-di-GMP Konzentrationen gemessen werden (s. Abbildung 20B).

In $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ sind 294 bzw. 164 Gene differenziell exprimiert (s. Abbildung 21), was zusammengenommen einen Anteil von ca. 6% aller ORFs in *S. venezuelae* ausmacht. Ein Vergleich der Transkriptionsprofile der beiden Mutanten ergab, dass 23% der differenziell regulierten Gene in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ überlappen (s. Abbildung 22). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass insbesondere RmdA aber auch RmdB neben einer gemeinsamen Gruppe an Genen auch jeweils eine für sie charakteristische Gruppe an Genen beeinflussen. Überraschenderweise sind unter den differenziell regulierten Genen in $\Delta rmdA$ und insbesondere $\Delta rmdB$ nur wenige BldD-Zielgene (s. Abbildung 21) vertreten. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das BldD-Regulon in *S. venezuelae* Kulturproben identifiziert wurde, welche in Flüssigmedium kultiviert wurden, und dass die Gesamt-RNA, welche als Grundlage für die Transkriptomanalyse diente, aus Makrokolonien isoliert wurde (Tschowri et al. 2014). Weiterhin werden einige BldD-Zielgene möglicherweise auch von weiteren Transkriptionsregulatoren wie MtrA oder BldC reguliert, welche sowohl als Transkriptionsaktivatoren als auch als Transkriptionsrepressoren fungieren können (Som et al. 2017; Schumacher, den Hengst, et al. 2018). So kann MtrA unter anderem an die Promotoren von *bldM*, *bldN* sowie *whiG* binden, während BldC an die Promotoren von *bldM*, *whiB*, *whiD* und *whiH* binden kann (Som et al. 2017; Schumacher, den Hengst, et al. 2018). Welchen Einfluss MtrA und BldC auf die Regulation der genannten Gene in *S. venezuelae* haben, ist noch nicht abschließend geklärt.

3.5.1 Die Regulation der Expression der hydrophoben Bestandteile von Lufthyphen ist c-di-GMP abhängig

Die Einleitung der reproduktiven Wachstumsphase geht mit der Ausbildung hydrophober Lufthyphen einher. Die Chaplin- und Rodlinproteine stellen die Hauptbestandteile der hydrophoben Schicht dar, welche für die Durchbrechung der wässrigen Phase verantwortlich ist (Elliot et al. 2003; Claessen et al. 2003; Bibb et al. 2012). Dabei assemblieren die Chaplin-Proteine zu amyloidartigen Filamenten und werden von den Rodlin-Proteinen zu sogenannten *Rodlets* gebündelt (Elliot et al. 2003; Claessen et al. 2003; Bibb et al. 2012). Die Expression der Chaplin und Rodlin kodierenden Gene wird durch den ECF-Sigmafaktor σ^{BldN} aktiviert, dessen kodierendes Gen *bldN* wiederum unter direkter transkriptioneller Kontrolle von BldD steht (den Hengst et al. 2010; Bibb et al. 2012). Neben BldD wird die Funktion von σ^{BldN} auch von seinem membranständigen Anti-Sigmafaktor RsbN reguliert, dessen Funktion vermutlich über ein äußeres Signal inaktiviert wird (Schumacher, Bush, et al. 2018).

Wie aus der Transkriptom-Analyse (s. Abbildung 23) und aus den zur Verifizierung durchgeführten qRT-PCR Experimenten (s. Abbildung 24) hervorgeht, ist *bldN* in $\Delta rmdA$ signifikant und in $\Delta rmdB$ nicht signifikant herunterreguliert. Die Auswirkung der reduzierten *bldN* Expression spiegelt sich in beiden Mutanten in einer differenziell regulierten Expression

der für die oben genannten Bestandteile der hydrophoben Schicht kodierenden Gene wider. Die Expression einiger Chaplin und Rodlin kodierender Gene ist in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ signifikant herunterreguliert (s. Abbildung 23). Dieses Ergebnis konnte mittels qRT-PCR Experimenten (s. Abbildung 24) beispielhaft für die Gene *chpC*, *chpE* und *chpH* in $\Delta rmdA$, und für *chpC* und *chpH* in $\Delta rmdB$ verifiziert werden. Mit dem in Abbildung 25 aufgeführten Wassertest konnte weiterhin experimentell bewiesen werden, dass Kolonien der Stämme $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ im Gegensatz zu Kolonien von *S. venezuelae* WT auch nach 48 Stunden keine hydrophobe Oberfläche aufweisen.

Die konstitutive Expression von einzelnen Chaplin kodierenden Genen führt zu einer teilweisen Kompensierung des Phänotyps von $\Delta rmdB$ (s. Abbildung 26). Es wird vermutet, dass die Expression von verschiedenen Chaplingenen zum selben Zeitpunkt nötig ist, um eine funktionale hydrophobe Schicht bilden zu können und dass die Überexpression einzelner Chaplin kodierender Gene dies nur partiell vermag. In $\Delta rmdA$ führt die Expression des Leerplasmids pMS82 zu einer teilweisen Kompensierung des Phänotyps, weshalb die beobachteten Effekte bei der konstitutive Expression der *chp*-Gene als unspezifische Effekte betrachtet werden müssen.

Der resultierende Phänotyp nach konstitutiver Expression von *bldN* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ (s. Abbildung 27) bestätigt die Hypothese, dass die Expression verschiedener Chaplingenen zum selben Zeitpunkt nötig ist, um eine funktionale hydrophobe Schicht aufzubauen und ein Luftmyzel ausbilden zu können. Sowohl in $\Delta rmdA$ als auch in $\Delta rmdB$ führt eine Überexpression von *bldN* zu einer vollständigen Unterdrückung der Phänotypen.

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Ausbildung der amyloidartigen und hydrophoben Schicht aus Chaplin- und Rodlin-Proteinen in *S. venezuelae* c-di-GMP-abhängig ist und höchstwahrscheinlich über die reprimierende Funktion von c-di-GMP-Effektorprotein BldD integriert wird, welcher unter anderem die Expression von *bldN* reprimiert (den Hengst et al. 2010). Die konstitutive Expression von *bldN* (s. Abbildung 27) verdeutlicht dieses Ergebnis nochmals.

Die Integration von c-di-GMP in die Regulation der Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten ist in vielen Bakterien bekannt, c-di-GMP fungiert aber in den meisten Modellen als ein aktivierendes Signal. So wird die Expression von *csgA* und *csgB*, welche in *E. coli* für die Hauptbestandteile der Curli-Fasern kodieren, durch c-di-GMP aktiviert (Pesavento et al. 2008). Auch in *Acetobacter xylinum* (ehemals *Gluconacetobacter xylinus*), dem Organismus in welchem c-di-GMP erstmals beschrieben wurde, ist c-di-GMP bei der Aktivierung der Zellulose-Synthese beteiligt (Ross et al. 1987).

3.5.2 Auch die Einleitung und Regulation der Sporulation wird durch c-di-GMP reguliert

Auf die Ausbildung von hydrophoben Lufthyphen folgt die Einleitung der Sporulation, welche mit der synchronen Septierung der Lufthyphen einhergeht (Flardh and Buttner 2009; Tschowri 2016). Die multigenomischen Hyphen werden dabei in eine Vielzahl an unigenomischen Pre-Sporen unterteilt (Flardh and Buttner 2009; Tschowri 2016). Bei diesem Prozess stehen Faktoren zur Zellwandmodellierung und DNA-Organisation im Mittelpunkt. So ist es nicht verwunderlich, dass in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ die Expression von *ssgA*, *rpfA* sowie *swIA* herunterreguliert ist (s. Abbildung 23). Das Gen *ssgA* kodiert für SsgA, welches zusammen mit SsgB für die Lokalisierung und Assemblierung von FtsZ verantwortlich ist (Willemse et al. 2011; Jakimowicz and van Wezel 2012; Haeusser and Margolin 2016). Die Gene *rpfA* und *swIA* kodieren für Zellwandhydrolasen und sind für die Zellwandmodellierung zuständig (Haiser, Yousef, and Elliot 2009).

Auch der Transkriptionsregulator BldM ist während der Einleitung der Sporulation und darüber hinaus für die Regulation der späten Sporulationsphase essenziell. BldM aktiviert als Homodimer die Expression des sogenannten *group I gene clusters* (Al-Bassam et al. 2014). Das *group I gene cluster* umfasst dabei Gene, welche für Faktoren wie SsgB, SsgR und WhiB kodieren, die in der frühen Sporulationsphase die oben genannten Prozesse umsetzen oder sie regulieren (Al-Bassam et al. 2014). So aktiviert Transkriptionsregulator SsgR die Expression von *ssgA*, dessen Expression sowohl in $\Delta rmdA$ als auch in $\Delta rmdB$ herunterreguliert ist (Traag, Kelemen, and Van Wezel 2004). WhiB aktiviert zusammen mit WhiA unter anderem die Expression von *ftsZ* und *whiG* (Bush et al. 2013; Bush et al. 2016). Im weiteren Verlauf aktiviert BldM als Heterodimer mit WhiL die Transkription des sogenannten *group II gene clusters*. Dieses umfasst unter anderem das *smeA-ssfA* Operon sowie *whiE* (Al-Bassam et al. 2014). Die Expression von *bldM* selbst wird durch BldD reprimiert und durch σ^{BldN} aktiviert (den Hengst et al. 2010; Tschowri et al. 2014; Schumacher, den Hengst, et al. 2018). Entsprechend wurde vermutet, dass die Expression von *bldM* in $\Delta rmdA$ als auch in $\Delta rmdB$ aufgrund der höchstwahrscheinlich andauernden Aktivität von BldD, hervorgerufen durch die erhöhten c-di-GMP Konzentrationen in den Deletionsstämmen, und der damit einhergehenden Repression von *bldN* negativ reguliert sein müsste. Tatsächlich ist die Expression von *bldM* in $\Delta rmdA$ signifikant und in $\Delta rmdB$ nicht signifikant herunter reguliert (s. Abbildung 23 und Abbildung 24).

Die Repression von *bldM* äußert sich in der Transkriptionsanalyse durch die erniedrigte Expression des *smeA-ssfA* Operons in $\Delta rmdA$ (s. Abbildung 23). SffA fungiert als DNA-Translokase und hilft bei der Segregation von Chromosomen in die sich entwickelnden Sporen (Ausmees et al. 2007). SmeA ist für die Lokalisierung von SffA an die Sporulationssepta

verantwortlich (Ausmees et al. 2007). Weiterhin kann die mittels Immunodetektion festgestellte, verringerte Generierung von FtsZ (s. Abbildung 9) indirekt auf die differenzielle Regulation von *bldM* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zurückgeführt werden. Die Expression von *ftsZ* wird von BldD reprimiert und durch den WhiAB-Komplex aktiviert, wobei *whiB* wiederum Teil des *group I gene clusters* ist (den Hengst et al. 2010; Al-Bassam et al. 2014; Bush et al. 2016).

Wie in Abbildung 27 gezeigt, führt die konstitutive Expression von *bldM* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zu einer vollständigen Unterdrückung der Phänotypen. Diese Ergebnisse heben die Bedeutung von BldM in der Entwicklungsregulation von *S. venezuelae* hervor und verdeutlichen ein weiteres Mal den Effekt erhöhter c-di-GMP Konzentrationen, welche zu diesem Zeitpunkt über BldD integriert werden und unter anderem zu einer Reprimierung von *bldM* führt.

Während in $\Delta rmdA$ mit *whiD*, *whiH* und *whiI* die Expression von Genen signifikant herunterreguliert ist (s. Abbildung 23), welche für wichtige Whi-Regulatoren der fortgeschrittenen Sporulationsphase kodieren, ist in $\Delta rmdB$ *whiH* signifikant sowie *whiI* nicht signifikant herunterreguliert (s. Abbildung 23 und Abbildung 37) (Al-Bassam et al. 2014; Gallagher et al. 2020). Sowohl WhiH als auch WhiI fungieren als Transkriptionsregulatoren und aktivieren dabei die Expression einer Vielzahl von Genen, welche für Faktoren wie SsfA und SmeA sowie Regulatoren wie WhiE kodieren, die wiederum zur Sporenreifung benötigt werden (Al-Bassam et al. 2014; Gallagher et al. 2020). Die Expression von *whiH* und *whiI* wird durch Sigmafaktor σ^{WhiG} aktiviert, welcher somit indirekt die Expression von über 100 Genen kontrolliert (Gallagher et al. 2020). Die Aktivität von σ^{WhiG} selbst wird wiederum von Anti-Sigmafaktor RsiG kontrolliert, welcher als c-di-GMP Effektorprotein identifiziert wurde (Gallagher et al. 2020). In Anwesenheit von c-di-GMP unterbindet RsiG dabei die Funktion von σ^{WhiG} als Sigmafaktor durch Bindung an diesen.

Diese Erkenntnis und die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse weisen darauf hin, dass sowohl RmdA als auch RmdB die Aktivitäten von c-di-GMP-Effektorprotein BldD als auch von σ^{WhiG} über c-di-GMP-Effektorprotein RsiG modulieren. Die Funktion von RsiG, σ^{WhiG} zu binden und dadurch dessen Funktion als Sigmafaktor zu inhibieren, ist von der Verfügbarkeit von c-di-GMP abhängig und wird vermutlich durch den Überschuss an c-di-GMP in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ verstärkt, wodurch die verringerte Expression von *whiH* und *whiI* erklärt werden kann.

3.6 RmdB interagiert mit dem Sigmafaktor σ^{WhiG} in Co-Elutionsassays

Wie in Abbildung 28 gezeigt, konnte GST-RmdB in Gegenwart von His-WhiG nach Reinigung mittels Ni-NTA Chromatografie und His-WhiG in Gegenwart von GST-RmdB nach Reinigung mittels Glutathion-Chromatografie, spezifisch co-eluiert werden. RsiG, welches zusammen mit

His-WhiG co-exprimiert wurde, interagiert wie in (Gallagher et al. 2020) beschrieben mit His-WhiG, wird jedoch nicht mit GST-RmdB nach Reinigung über Glutathion-Sepharose co-eluiert.

Dieses Ergebnis impliziert eine spezifische Interaktion zwischen RmdB und dem Sigmafaktor σ^{WhiG} und würde, bei Bestätigung dieses Ergebnisses, die erste direkte Interaktion zwischen einem c-di-GMP metabolisierenden Protein und einem wichtigen Faktor der Entwicklungsregulation in der Gattung *Streptomyces* darstellen. Sigmafaktor σ^{WhiG} wird von Antisigmafaktor RsiG in Gegenwart von c-di-GMP gebunden und dadurch inaktiviert (Gallagher et al. 2020). Die Interaktion mit RmdB lässt die Hypothese zu, dass RmdB die Bindung zwischen σ^{WhiG} und RsiG durch Hydrolyse des bindungsvermittelnden c-di-GMP-Dimers löst und damit σ^{WhiG} aktiviert. Die Bedeutung von σ^{WhiG} für die Differenzierung von *S. venezuelae* konnte umfassend gezeigt werden und die Integration von c-di-GMP in die Regulation der späten Entwicklungsphase stellt eine wichtig Erkenntnis in der Erforschung der Entwicklung von *Streptomyces* dar (Gallagher et al. 2020).

Die putative Interaktion von RmdB und σ^{WhiG} muss in weiteren Experimenten verifiziert werden. Außerdem sollten die Experimente auch mit RmdA durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die gezeigte Interaktion RmdB spezifisch ist oder möglicherweise nur von der Funktion, c-di-GMP zu binden, abhängt.

Erste Ansätze, die Interaktion zwischen RmdB und σ^{WhiG} bzw. RsiG nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. Wie in Abbildung 29 gezeigt, konnte mittels *Bacterial-Two-Hybrid* in keiner der getesteten Kombinationen eine Interaktion nachgewiesen werden. Dieselben BTH Experimente wurden auch mit RmdA und σ^{WhiG} bzw. RsiG durchgeführt (s. Abbildung 29) und auch hier konnte keine Interaktion festgestellt werden. Möglicherweise führt die Fusion mit den T18- und T25-Fragmenten zu einer fehlerhaften Faltung der Proteine, welches eine Interaktion verhindert. Weiterhin beinhalten die eingesetzten BTH-Konstrukte die nativen Gensequenzen, so dass Präzipitationsereignisse, hervorgerufen durch die N-terminalen Transmembrandomänen von RmdB oder die unlösliche N-terminale Domäne von RmdA, nicht ausgeschlossen werden können. Auch BTH Experimente, welche eine Dimerisierung von RmdA bzw. RmdB (s. Abbildung 36) untersuchen sollten, ergaben kein Anzeichen von Interaktion. Dieses Ergebnis ist insbesondere für RmdA verwunderlich, da dieses Protein in den durchgeführten Enzymassays eindeutig Diguanylatzyklaseaktivität aufwies (s. Abbildung 16B). Die Synthese von c-di-GMP kann nur von homodimeren Proteinen erzeugt werden (Ross et al. 1987; Paul et al. 2007). Die Kondensation von zwei GTP-Molekülen zu c-di-GMP läuft in zwei Stufen ab, wobei zunächst jeweils ein GTP-Molekül an ein GG(D/E)EF-Motiv gebunden wird und nach Abspaltung von zwei Pyrophosphaten (PPi) c-di-GMP als Endprodukt gebildet wird (Ross et al. 1987; Paul et al. 2007).

Auch in den durchgeführten Co-Elutionsexperimenten, in welchen RmdA-FLAG und RmdB-FLAG über eine Anti-FLAG-Antikörper-Matrix gereinigt wurden, konnte kein WhiG oder RsiG identifiziert werden (s. Abbildung 30). Weitere Immunodetektions-Ansätze mit spezifischen Antikörpern gegen BldD, BldM, BldN und RsbN waren ebenfalls nicht erfolgreich (s. Abbildung 30). Bei diesen Co-Elutionsexperimenten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die gereinigten Proteinmengen an RmdA-FLAG und RmdB-FLAG sehr gering ausfielen (s. Abbildung 38). Entsprechend kann aus diesen Experimenten keine abschließende Schlussfolgerung auf mögliche Interaktionen mit den oben genannten Proteinen getroffen werden.

3.7 Modell der Entwicklungsmodulation von *S. venezuelae* durch RmdA und RmdB

Die Proteine RmdA und RmdB konnten als wichtige Bestandteile der Entwicklungsregulation von *S. venezuelae* identifiziert werden. Die in dieser Arbeit abgeleiteten Erkenntnisse sind in Abbildung 31 grafisch als Modell zusammengefasst.

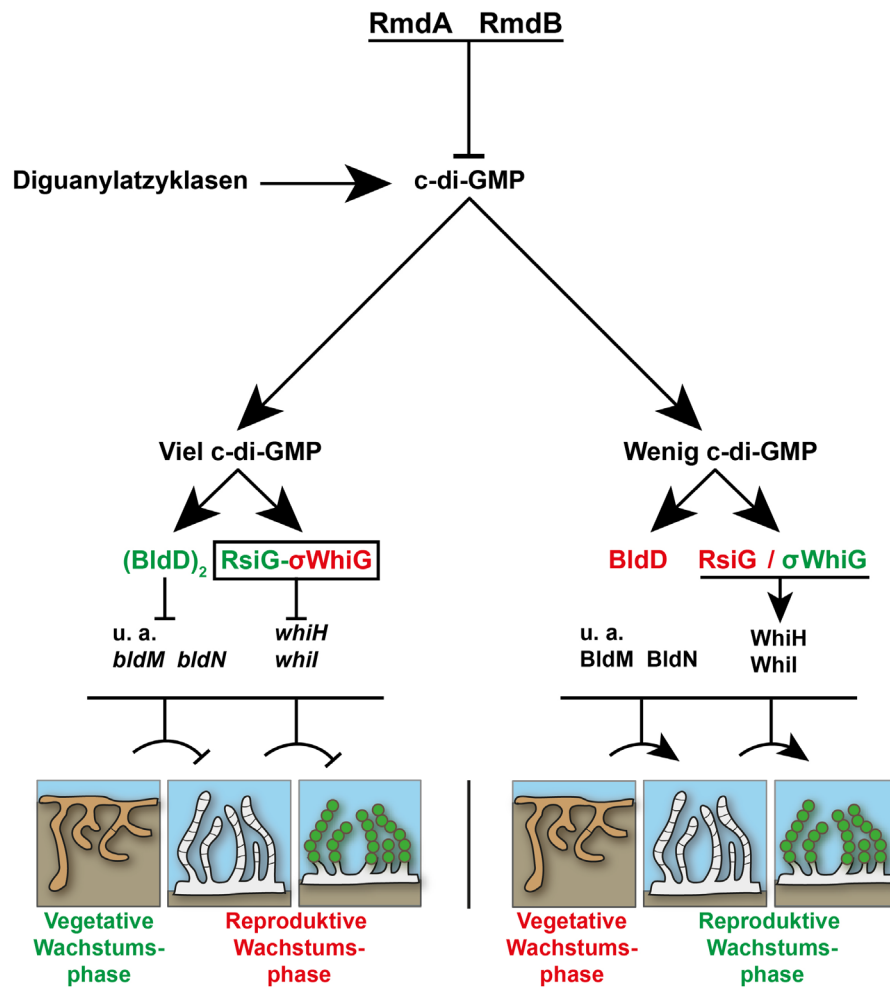


Abbildung 31: RmdA und RmdB modulieren durch ihre PDE-Aktivität den charakteristischen Entwicklungsverlauf von *S. venezuelae*. Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* führt in *S. venezuelae* zu einer ausgeprägten Verzögerung der Entwicklung, welche auf die c-di-GMP metabolisierende Aktivität der kodierenden Proteine zurückzuführen ist. RmdA und RmdB konnten als aktive Phosphodiesterasen charakterisiert werden, welche den globalen zellulären c-di-GMP Spiegel in *S. venezuelae* beeinflussen und in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zumindest zeitweise zu erhöhten zellulären c-di-GMP Konzentrationen führen. RmdA ist vorrangig während der vegetativen Wachstumsphase und beim Übergang in die reproduktive Wachstumsphase aktiv, wohingegen RmdB als Master-PDE zu allen untersuchten Zeitpunkten für die c-di-GMP Hydrolyse verantwortlich ist. C-di-GMP wird in *S. venezuelae* durch BldD und Anti-Sigmafaktor RsiG in die Entwicklungsregulation integriert, wobei BldD als Transkriptionsrepressor und Hauptregulator der Entwicklung den Übergang von der vegetativen Wachstumsphase in die reproduktive Wachstumsphase verzögert (Tschowri et al. 2014; Gallagher et al. 2020). BldD ist nur in Form eines Homodimers als Transkriptionsfaktor funktional, wobei c-di-GMP für die Dimerisierung essenziell ist (Tschowri et al. 2014). Antisigmafaktor RsiG bindet, in Anwesenheit von c-di-GMP, Sigmafaktor σ^{WhiG} und inaktiviert diesen dadurch, wodurch die Sporulation verzögert wird (Gallagher et al. 2020). Die Verzögerung der Entwicklung von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ wird auf die erhöhten zellulären c-di-GMP Konzentrationen in den Deletionsmutanten zurückgeführt, wodurch BldD und RsiG vermutlich ihre Funktionen länger ausüben können. So konnten die BldD Zielgene *bldN* und *bldM* in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ als differenziell reguliert identifiziert werden, wobei σ^{BldN} unter anderem die Expression der Chaplin und Rodlin kodierenden Gene aktiviert, deren Expression wiederum in $\Delta rmdA$ wie auch in $\Delta rmdB$ als herunterreguliert identifiziert wurde (Bibb et al. 2012). Dies äußert sich in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ durch eine verzögerte Produktion der hydrophoben Schicht, welche für die Ausbildung von Lufthyphen benötigt wird. Sowohl die konstitutive Expression von *bldN* als auch von *bldM* konnte den Phänotyp von $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ unterdrücken. Sigmafaktor σ^{WhiG} aktiviert die Expression von *whiH* und *whiI*, welche für die Einleitung der Sporulation essenziell sind. Beide Gene sind in $\Delta rmdA$ -und *whiH* in $\Delta rmdB$ signifikant herunterreguliert, was die Hypothese unterstützt, dass Sigmafaktor σ^{WhiG} in den Deletionsmutanten aufgrund der erhöhten c-di-GMP Konzentrationen länger durch RsiG inaktiviert wird.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten kann geschlussfolgert werden, dass RmdA und RmdB in *S. venezuelae* aktive Phosphodiesterasen sind, welche zumindest zeitweise den globalen zellulären c-di-GMP Spiegel beeinflussen. RmdB ist als *Master-PDE* während des gesamten Entwicklungszyklus aktiv, wohingegen RmdA insbesondere während der vegetativen Wachstumsphase und beim Übergang zur reproduktiven Wachstumsphase für die Hydrolyse von c-di-GMP verantwortlich ist. Welchen Einfluss RmdA und RmdB auf die Entwicklungsregulation haben, konnte sowohl auf Transkriptionsebene als auch durch phänotypische Experimente gezeigt werden.

Die Deletion von *rmdA* und *rmdB* bewirkt eine ausgeprägte Verzögerung der Differenzierung, welche vermutlich durch die erhöhten c-di-GMP Konzentrationen in den Deletionsstämmen hervorgerufen wird. Die Signalwirkung von c-di-GMP wird in *S. venezuelae* über BldD und Antisigmafaktor RsiG in die Entwicklungsregulation integriert, wobei BldD als Transkriptionsrepressor und Hauptregulator der Entwicklung den Übergang von der vegetativen Wachstumsphase in die reproduktive Wachstumsphase verzögert (Tschowri et al. 2014; Gallagher et al. 2020). BldD benötigt c-di-GMP für die Dimerisierung und nur in dieser Konformation kann (BldD)₂ als Transkriptionsrepressor fungieren (Tschowri et al. 2014). Antisigmafaktor RsiG bindet, in Gegenwart von c-di-GMP, Sigmafaktor σ^{WhiG} und inaktiviert diesen dadurch, wodurch die Sporulation verzögert wird (Gallagher et al. 2020). Mittels Transkriptomanalysen konnten in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ mit *bldM*, *bldN*, *whiH* und *whiI* direkte BldD bzw. Sigmafaktor σ^{WhiG} Zielgene als herunterreguliert identifiziert werden. Die differenzielle Regulation von *bldN* führt in $\Delta rmdA$ und $\Delta rmdB$ zu einer verringerten Expression der Chaplin und Rodlin kodierenden Gene, wobei experimentell gezeigt werden konnte, dass dies zu einer verzögerten Ausbildung der hydrophoben Schicht führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von BldD-Zielgen *ftsZ* in $\Delta rmdB$ im Gegensatz zu *S. venezuelae* WT verzögert und in $\Delta rmdA$ nur schwach ausgeprägt ist.

Die in Co-Elutionsexperimenten festgestellte Interaktion zwischen RmdB und Sigmafaktor σ^{WhiG} lässt die Hypothese zu, dass RmdB die c-di-GMP vermittelte Bindung zwischen RsiG und Sigmafaktor σ^{WhiG} durch seine Phosphodiesteraseaktivität löst und somit die Funktion von Sigmafaktor σ^{WhiG} aktiviert. Bei Validierung dieser Erkenntnis, würde dies die erste direkte Interaktion zwischen einem Entwicklungsregulator und einem c-di-GMP metabolisierenden Enzym in *S. venezuelae* darstellen.

Die Ergebnisse und Beobachtungen dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die enzymatische Aktivität von RmdA und RmdB die Aktivität von BldD und RsiG modulieren und damit die Differenzierung von *S. venezuelae* beeinflussen können.

4 Material und Methoden

4.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ ϕ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Taylor, Walker, and McInnes 1993)
W3110	K-12 derivative; F ⁻ , λ ⁻ , <i>rpoS</i> (Am), <i>rph-1</i> , <i>Inv</i> (<i>rrnD-rrnE</i>)	(Hayashi et al. 2006)
W3110 Δ <i>cya</i>	W3110 Derivat mit deletierter adenylate cyclase	(Herbst et al. 2018)
ET12567/pUZ8002	<i>dam, dcm, hsd</i> ; Kan ^R , Cm ^R	(Paget et al. 1999)
BW25113/pIJ790	(Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -4), <i>lacI</i> p-4000(<i>lacI</i> ^Q), λ ⁻ , <i>rpoS</i> 369(Am), <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514; Cm ^R	(Datsenko and Wanner 2000)
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> λ(DE3), Cm ^R	Promega
BL21 (DE3) pLysS Rosetta™	: F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagene
HME68	W3110 Δ(<i>argF-lac</i>)U169 <i>galK</i> tyr145UAG <i>mutS</i> <> <i>cat</i>	(Thomason et al. 2014)
<i>S. venezuelae</i>		
NRRL B-65442	Wildtyp	(NCBI Reference Sequence: NZ_CP018074.1)
SVNT26	<i>rmdB</i> :: <i>apr</i> , Apr ^R	(Al-Bassam et al. 2018)
SVNT27	<i>rmdA</i> :: <i>apr</i> , Apr ^R	(Al-Bassam et al. 2018)

SVNT31	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::p3xFLAG- <i>rmdA</i> ; Apr ^R , Hyg ^R	(Al-Bassam et al. 2018)
SVNT39	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::p3xFLAG- <i>rmdB</i> ; Apr ^R , Hyg ^R	(Al-Bassam et al. 2018)
SV13	WT; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pIJ10750-P _{ftsZ} - <i>ftsZ-ypet</i> , Hyg ^R	(Schlimpert et al. 2017)
SVJH4	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::p3xFLAG- <i>rmdB</i> ^{GGAFF} ; Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH11	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pIJ10257, Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH12	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pIJ10257, Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH15	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82, Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH16	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82, Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH17	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpB</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH18	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpC</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH19	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpD</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH20	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpE</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH21	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpF</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH22	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpH</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH23	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpB</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH24	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpC</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH25	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpD</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH26	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpE</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH27	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpF</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH28	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB</i> _{ΦBT1} ::pMS82- <i>chpH</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH29	<i>rmdA::rmdA</i> ^{ALLEF}	(Haist et al. 2020)

SVJH30	<i>rmdA::rmdA^{AAA}</i>	(Haist et al. 2020)
SVJH31	<i>rmdB::rmdB^{AAA}</i>	(Haist et al. 2020)
SVJH32	<i>rmdA::apr</i> , <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10750-P_{ftsZ}-ftsZ-ypet</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH33	<i>rmdB::apr</i> , <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10750-P_{ftsZ}-ftsZ-ypet</i> , Apr ^R , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
SVJH34	<i>rmdA::apr</i> , <i>attB_{ΦBT1}::pSS172-rmdA-mcherry</i> , Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH35	<i>rmdB::apr</i> , <i>attB_{ΦBT1}::pSS172-rmdB-mcherry</i> , Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH36	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10257-bldM</i> , Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH37	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10257-bldM</i> , Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH38	<i>rmdA::apr</i> ; <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10257-bldN</i> , Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVJH39	<i>rmdB::apr</i> ; <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10257-bldN</i> , Apr ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
SVSN84	WT; <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10257-bldM</i> , Hyg ^R	Sara Neumann
SVSN85	WT; <i>attB_{ΦBT1}::pIJ10257-bldN</i> , Hyg ^R	Sara Neumann
SVNB3	WT; <i>attB_{ΦBT1}::pSS172-mcherry</i> , Hyg ^R	Niclas Barke

4.2 Plasmide und Cosmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Cosmide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide und Cosmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pIJ773	Enthält die Genkassette <i>apr-oriT</i> ; Apr ^R	(Gust et al. 2003)
pIJ790	Modifiziertes λRED Rekombinationsplasmid, [oriR101] [repA101(ts)] <i>araBp-gam-be-exo</i> ; Cm ^R	(Gust et al. 2003)

pIJ10170	pMS82 Derivat; Hyg ^R	(Schlimpert et al. 2017)
pIJ10257	Enthält die Sequenz des konstitutiven Promotor <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Hong et al. 2005)
pIJ10257 <i>bldM</i>	Enthält <i>bldM</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	JIC, Norwich, UK
pIJ10257 <i>bldN</i>	Enthält <i>bldN</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	JIC, Norwich, UK
pIJ10663	pET15b- <i>bldD</i> -Full, zur Generierung von His-BldD, Amp ^R	(Tschowri et al. 2014)
pIJ10907	pKT25- <i>whiG</i> , Kan ^R	(Gallagher et al. 2020)
pIJ10908	pKNT25- <i>whiG</i> , Kan ^R	(Gallagher et al. 2020)
pIJ10909	pUT18- <i>whiG</i> , Amp ^R	(Gallagher et al. 2020)
pIJ10910	pUT18C- <i>whiG</i> , Amp ^R	(Gallagher et al. 2020)
pIJ10911	pKT25- <i>rsiG</i> , Kan ^R	(Gallagher et al. 2020)
pIJ10912	pUT18- <i>rsiG</i> , Amp ^R	(Gallagher et al. 2020)
pKNT25- <i>rsiG</i>	pKNT25- <i>rsiG</i> , Kan ^R	JIC, Norwich, UK
pUT18C- <i>rsiG</i>	pUT18C- <i>rsiG</i> , Amp ^R	JIC, Norwich, UK
pIJ10914	pCOLADuet-1 mit <i>whiG</i> in MCS1 und <i>rsiG</i> in MCS2, Kan ^R	(Gallagher et al. 2020)
pUZ8002	RP4 Derivat mit defektem oriT; Kan ^R	(Paget et al. 1999)
pQE60	pQE60- <i>pdeH</i> , zur Generierung von PdeH-His, Amp ^R	(Pesavento et al. 2008)
pRP89	pET11- <i>pleD</i> [*] , zur Generierung von PleD [*] -His, Amp ^R	(Paul et al. 2004)
pSS05	pIJ10750-P _{ftsZ} - <i>ftsZ</i> - <i>ypet</i> , Fusion von FtsZ mit YPet, Hyg ^R	(Schlimpert et al. 2017)

pSS172	pIJ10770 Derivat mit <i>mcherry</i> für die Konstruktion von C-terminalen mCherry-Fusionen, Hyg ^R	(Schlimpert et al. 2017)
p3xFLAG	pIJ10170 Derivat, für die Konstruktion von C-terminalen 3xFLAG-Fusionen; Hyg ^R	(Al-Bassam et al. 2018)
pMS82- <i>chpB</i>	Enthält <i>chpB</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pMS82- <i>chpC</i>	Enthält <i>chpC</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pMS82- <i>chpD</i>	Enthält <i>chpD</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pMS82- <i>chpE</i>	Enthält <i>chpE</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pMS82- <i>chpF</i>	Enthält <i>chpF</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pMS82- <i>chpH</i>	Enthält <i>chpH</i> unter Kontrolle des konstitutiven Promotors <i>ermE</i> [*] , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pET15b	T7 Expressionsplasmid; für die Konstruktion von N-terminalen 6xHis-Fusionen, Amp ^R	Novagen
pGEX_6p1	TAC Expressionsplasmid; für die Konstruktion von N-terminalen GST-Fusionen, Amp ^R	Amersham
pMAL-c2	TAC Expressionsplasmid, für die Konstruktion von N-terminalen MbP-Fusionen, Amp ^R	NEB
pKT25	Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit N-terminalem T25-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; lac-Promotor; Kan ^R	(Karimova et al. 1998)
pKNT25	Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalem T25-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; lac-Promotor; Kan ^R	(Karimova et al. 1998)

pUT18	Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalem T18-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; lac-Promotor; Kan ^R	(Karimova et al. 1998)
pUT18C	Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit N-terminalem T18-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; lac-Promotor; Kan ^R	(Karimova et al. 1998)
pKT25- <i>zip</i>	pKT25-Leucine-Zipper; Kontroll-Plasmid BTH; Kan ^R	(Karimova et al. 1998)
pUT18C- <i>zip</i>	pUT18C-Leucine-Zipper; Kontroll-Plasmid BTH; Kan ^R	(Karimova et al. 1998)
pSVJH01	p3xFLAG <i>rmdA</i> -FLAG, Hyg ^R	(Al-Bassam et al. 2018)
pSVJH02	p3xFLAG <i>rmdB</i> -FLAG, Hyg ^R	(Al-Bassam et al. 2018)
pSVJH03	p3xFLAG- <i>rmdB</i> ^{GGAFF} , Hyg ^R	(Haist et al. 2020)
pSVJH07	pSS172- <i>rmdA</i> - <i>mcherry</i> , Hyg ^R	Diese Arbeit
pSVJH08	pSS172- <i>rmdB</i> - <i>mcherry</i> , Hyg ^R	Diese Arbeit
pECJH1	pET15b- <i>rmdB</i> , Amp ^R	(Haist et al. 2020)
pECJH2	pMALc2- <i>rmdA</i> ; Amp ^R	(Haist et al. 2020)
pECJH3	pMALc2- <i>rmdA</i> ^{GGAFF} ; Amp ^R	(Haist et al. 2020)
pECJH4	pET15b- <i>rmdB</i> ^{GGDEF} ; Amp ^R	Diese Arbeit
pECJH5	pET15b- <i>rmdB</i> ^{EAL} ; Amp ^R	(Haist et al. 2020)
pECJH6	pKT25- <i>rmdA</i> , Kan ^R	Diese Arbeit
pECJH7	pKNT25- <i>rmdA</i> , Kan ^R	Diese Arbeit
pECJH8	pUT18- <i>rmdA</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pECJH9	pKT25- <i>rmdB</i> , Kan ^R	Diese Arbeit

pECJH10	pKNT25- <i>rmdB</i> , Kan ^R	Diese Arbeit
pECJH11	pUT18- <i>rmdB</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pECJH12	pUT18C- <i>rmdB</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pECJH13	pUT18C- <i>rmdB-rsiG</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pECJH14	pGEX-6p1- <i>rmdB</i>	Diese Arbeit
SV-2_B03	Cosmid, enthält <i>rmdA</i> ; Kan ^R , Amp ^R	JIC, Norwich, UK
SV-3_B05	Cosmid, enthält <i>rmdB</i> ; Kan ^R , Amp ^R	JIC, Norwich, UK
SV-2_B03-apr ^R _oriT	<i>kan::apr-oriT</i> , Apr ^R , Amp ^R	(Haist et al. 2020)
SV-3_B05-apr ^R _oriT	<i>kan::apr-oriT</i> , Apr ^R , Amp ^R	(Haist et al. 2020)
SV-2_B03-apr ^R _oriT_ <i>rmdA</i> ^{ALLEF}	<i>kan::apr-oriT</i> ; <i>rmdA::rmdA</i> ^{ALLEF} , Apr ^R , Amp ^R	(Haist et al. 2020)
SV-2_B03-apr ^R _oriT_ <i>rmdA</i> ^{AAA}	<i>kan::apr-oriT</i> ; <i>rmdA::rmdA</i> ^{AAA} , Apr ^R , Amp ^R	(Haist et al. 2020)
SV-3_B05- apr ^R _oriT_ <i>rmdB</i> ^{AAA}	<i>kan::apr-oriT</i> ; <i>rmdB::rmdB</i> ^{AAA} , Apr ^R , Amp ^R	(Haist et al. 2020)

4.3 Nährmedien

Nährmedien wurden, wenn nicht anders beschrieben, in vollentsalztem (VE-) Wasser gelöst und durch Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Lösliche Zusätze, welche nicht autoklaviert werden konnten, wurden zunächst mittels Filter der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert und dann dem autoklavierten Nährmedium zugegeben.

4.3.1 Flüssigmedien

Lysogeny broth (LB-Medium)	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	VE-Wasser	Ad 1 L

LBnoS-Medium (LB ohne NaCl)	Siehe LB-Medium nur ohne Zugabe von NaCl	
MYM-Medium	Maltose	4 g
	Bacto-Hefeextrakt	4 g
	Bacto-Malzextrakt	10
	VE-Wasser	500 ml
	Leitungswasser	500 ml
	Nach dem Autoklavieren mit 2 ml Spurenelement-Lösung (TE) supplementiert	
<hr/>		
4.3.2 Festmedien		
LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Bacto-Agar	18 g
	VE-Wasser	Ad 1 L
<hr/>		
LBnoS-Agar (LB ohne NaCl)	Siehe LB-Agar nur ohne Zugabe von NaCl	
MYM-Agar	Maltose	4 g
	Bacto-Hefeextrakt	4 g
	Bacto-Malzextrakt	10 g
	Bacto-Agar	20 g
	VE-Wasser	500 ml
	Leitungswasser	500 ml
Nach dem Autoklavieren mit 2 ml Spurenelement-Lösung (TE) supplementiert		
<hr/>		
SFM-Agar (Soya Flour Mannitol)	Mannitol	20 g

	Sojamehl	20 g
	Bacto-Agar	20 g
	VE-Wasser	Ad 1 L
Nähragar (DNA-Agar)	Nähragar	22,8 g
	VE-Wasser	Ad 1 L
MacConkey-Agar supplementiert mit Maltose	MacConkey-Agar (Difco)	40 g
	Maltose	1%
	VE-Wasser	Ad 1 L
X-Gal-Agar	LB-Agar wurde mit 40 mg/l X-Gal (gelöst in DMF) versetzt	

4.3.3 Antibiotika

Zur Herstellung von Stammlösungen wurden die verwendeten Antibiotika in ddH₂O gelöst und anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Chloramphenicol wurde in 70% Ethanol gelöst. Verwendete Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	100	100
Apramycin	50	50
Chloramphenicol	15	15
Hygromycin	50	22 in Flüssigmedium 16 in Festmedium
Kanamycin	50	50
Nalidixinsäure	25	25

4.4 Kultivierung von Bakterienstämmen

4.4.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen

E. coli Stämme wurden in LB-Medium (s. 4.3.1) oder auf LB-Agarplatten (s. 4.3.2) sowie auf MacConkey-Agarplatten (s. 4.3.2) kultiviert. Die Inkubation erfolgte je nach Bedarf und Anwendung bei 37°C, 30°C, 28°C, 26°C oder 16°C. Die Kulturansätze wurden mit den jeweiligen Selektionsantibiotika (s. 4.3.3) supplementiert. Flüssigkulturen wurden im Maßstab von 5 ml bis 1 L in Glasröhrchen beziehungsweise Erlenmeyerkolben rotierend oder schüttelnd kultiviert.

4.4.2 Bestimmung der Zelldichte von *E. coli* Stämmen

Die Zelldichte von *E. coli* Stämmen in Flüssigmedium (s. 4.4.1) wurde anhand der optischen Dichte ermittelt. Die Messung erfolgte im Photometer (*GeneQuant 100*, GE) bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD₅₇₈), wobei die Proben so verdünnt wurden, dass die OD₅₇₈ im Bereich von 0,1-0,5 lag.

4.4.3 Konservierung von *E. coli* Stämmen

Zur Konservierung von *E. coli* Stämmen wurden diese über Nacht in LB-Medium (s. 4.3.1), supplementiert mit selektierenden Antibiotika (s. 4.3.3), kultiviert (s. 4.4.1). Anschließend wurden 930 µl Kultur mit 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth) versetzt und in Kryoröhrchen (Symport) überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.4.4 Kultivierung von *S. venezuelae* Stämmen

S. venezuelae Stämme wurden in MYM-Medium (s. 4.3.1) oder auf MYM-Agarplatten, Nähragarplatten oder SFM-Agarplatten (s. 4.3.2) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Flüssigkulturen wurden mit einer finalen Sporenkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Colony Forming Unit (CFU)/ml angeimpft. Flüssigkulturen wurden im Maßstab von 5 ml bis 500 ml in Glasröhrchen beziehungsweise Erlenmeyerkolben rotierend oder schüttelnd angezogen. Auf Festmedium wurde *S. venezuelae* in Form von Makrokolonien (s. 4.8.2) kultiviert.

4.4.5 Herstellung von *S. venezuelae* Sporensammlungen

S. venezuelae Stämme wurden in Form von Sporensammlungen konserviert. Für die Herstellung einer Sporensammlung wurde der entsprechende Stamm auf MYM-Agar (s. 4.3.2) ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Sporen wurden anschließend mit Hilfe eines sterilen Wattepad aufgenommen, welches zuvor mit 2 ml ddH₂O+ 20% Glycerin versetzt wurde. Die Sporenlösung wurde mit einer sterilen Spritze aus dem Wattepad gesaugt und in ein 1,2 ml Kryoröhrchen (Symport) überführt. Sporensammlungen wurden bei -80°C gelagert.

4.4.6 Bestimmung der koloniebildenden Einheit

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheit, im weiteren Verlauf CFU genannt, ist nötig, um *S. venezuelae* Kulturen mit einheitlichen Sporenkonzentrationen zu starten. Für die Bestimmung wurde 1 µl der Sporensammlungen in 99 µl LB-Medium (s. 4.3.1) aufgenommen und anschließend eine Verdünnungsreihe (seriell 1:10) bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} hergestellt. Von den Verdünnungsschritten 10^{-5} - 10^{-8} wurden je 10 µl in 90 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agar (s. 4.3.2) ausplattiert. Nach Inkubation bei 30°C für 24 Stunden wurden die angewachsenen Kolonien gezählt, unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors ein Mittelwert gebildet und anhand dessen die CFU pro µl ermittelt. Um eine spätere Kultivierung zu vereinfachen, wurde von jedem Stamm eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ CFU/µl hergestellt.

4.4.7 Aufzeichnung von Wachstumskurven mit *S. venezuelae* Stämmen

Um das Wachstumsverhalten von *S. venezuelae* Stämmen in MYM-Medium (s. 4.3.1) vergleichen zu können, wurden Wachstumskurven anhand der optischen Dichte der Kultur erstellt. Hierzu wurden die jeweiligen *S. venezuelae* Stämme in 100 ml MYM-Medium kultiviert (s.4.4.4). Die erste Probenentnahme erfolgte nach 8 Stunden und wurde anschließend stündlich wiederholt. Die zu messenden Proben wurden mittels MYM-Medium verdünnt, so dass der gemessene OD₅₇₈ Wert <0,4 ergab. Die Verdünnung wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

4.5 DNA-basierende Methoden

4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterienkultur erfolgte mittels *innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0* (AnalytikJena) nach Herstellerangaben.

4.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. venezuelae*

Die Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus *S. venezuelae* erfolgte mittels *innuPREP Bacteria DNA-Kit* (AnalytikJena) nach Herstellerangaben. Als Ausgangsmaterial wurde *S. venezuelae* Zellmaterial, kultiviert in 5 ml MYM-Medium (s.4.4.4), für 24 Stunden bei 26°C, eingesetzt.

4.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von isolierter Plasmid- oder genomischer DNA wurde mit Hilfe des *NanoDrop2000* Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben ermittelt.

4.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten und zum Einfügen von Genmutationen mittels spezifischer Oligonukleotide (s. Tabelle 7) genutzt. Die Amplifizierung von Genabschnitten für Klonierungen erfolgte mittels *Q5-High Fidelity DNA-Polymerase* (NEB). Die Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion ist in Tabelle 5 und das Standard-PCR-Programm in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 5: Standard PCR-Ansatz mit *Q5-High Fidelity DNA-Polymerase* (NEB)

Q5-High Fidelity DNA Polymerase	Volumen in µl
5x Q5-Reaction Buffer	10
5x Q5-High GC Enhancer	10
Desoxyribonukleotide (dNTPs) Mixture (NEB)	1
Vorwärts Oligonukleotid (10 mM)	1
Rückwärts Oligonukleotid (10 mM)	1
DNA-Template	Variabel*
Q5-High Fidelity DNA Polymerase	0,5
ddH ₂ O	Ad 50 µl

*Als DNA-Template wurde genomische, Plasmid- oder Cosmid-DNA eingesetzt.

Tabelle 6: Standard PCR-Programm

Funktion	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Primäre Denaturierung	5 Min.	98 °C	1
Denaturierung	15 Sek.	98 °C	
Hybridisierung	30 Sek.	variabel	

Elongation	1 kb/ 30 Sek.	72 °C	35
Finale Elongation	variabel	72 °C	1
Programmende	∞	4 °C	∞

4.5.5 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von durchgeführten Transformationsereignissen wurde die Kolonie-PCR eingesetzt. Dabei wurde Zellmaterial von auf Selektionsplatten angewachsenen Einzelkolonien in 1 ml ddH₂O aufgenommen und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Von diesem Ansatz wurden 1 µl als DNA-Template in der Kolonie-PCR eingesetzt. Mittels spezifischer Oligonukleotide (s. Tabelle 7) wurde ein Sequenzabschnitt der transformierten Vektor-DNA amplifiziert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde mittels *GelRed* Färbung (s. 4.5.8) und UV-Licht sichtbar gemacht und das Bandenmuster analysiert.

4.5.6 Generierung von Punktmutationen und Deletionen durch ortspezifische-Mutagenese

Für die Generierung von Punktmutationen und Deletionen in Plasmid-DNA wurde die ortspezifische-Mutagenese genutzt. Hierbei wurden zwei spezifische Oligonukleotide eingesetzt (s. Tabelle 7), welche gegenläufig an dem zu modifizierenden Abschnitt im Plasmid binden und mittels PCR die gesamte Plasmid-DNA amplifizieren. Zum Generieren von Punktmutationen enthielt dabei jeweils ein Oligonukleotid die entsprechende Modifikation. Wenn ganze Bereiche deletiert werden sollten, wurden Oligonukleotide eingesetzt, welche stromauf- und abwärts des zu deletierenden Bereiches binden. Das lineare PCR-Produkt wurde anschließend per *T4 Polynukleotid Kinase* (Thermo) unter Anwesenheit von ATP phosphoryliert. Nach erfolgter Ligation wurde das Ausgangsplasmid, welches im Unterschied zum modifizierten Amplifikat methyliert vorliegt, per DpnI-Restriktionsenzym verdaut. Die Ansätze wurden in elektrokompente *E. coli* W3110- oder DH5α-Zellen transformiert und angewachsene Klone per Kolonie-PCR (s. 4.5.5) untersucht. Positive Kandidaten wurden kultiviert (s. 4.4.1) und isoliertes Plasmid (s. 4.5.1) zum Sequenzieren (s. 4.5.15) eingeschickt.

4.5.7 Gibson Assembly zur Generierung von pUT18C-*rmdB-rsiG*

Der *Gibson Assembly* (Gibson et al. 2009) wurde zur Generierung von pUT18C-*rmdB-rsiG* (s. Tabelle 3) eingesetzt. Dabei werden an die zu fusionierenden DNA-Fragmente mittels Amplifikation durch PCR (s. 4.5.4) und spezifischen Oligonukleotiden (s. Tabelle 7) Überhänge angefügt, welche jeweils mit dem zu fusionierenden DNA-Fragment überlappende Sequenzbereiche aufweisen. Das Design der spezifischen Oligonukleotide (s. Tabelle 7)

erfolgte mittels des Online-Tools *NEBuilder Assembly Tool* von NEB. Die Durchführung des Gibson Assemblys erfolgte anschließend mittels *Gibson Assembly Cloning Kit* (NEB) nach Herstellerangaben.

4.5.8 Agarosegelelektrophorese, DNA-Färbung und DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihres Molekulargewichtes. Hierzu wurden DNA-Proben (z.B. PCR-Produkt) in 6x DNA-Ladepuffer aufgenommen und je nach Produktgröße auf ein 1-3 % Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein DNA-Längenstandard (100 bp-*DNA-Leiter extended* oder 1 kbp DNA-Leiter, Roth) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 90-120 V in 1x TAE-Puffer für 60 Minuten. Das Agarosegel wurde für 30 Minuten in einer *GelRed*-Lösung (*GelRed*, Genaxxon) inkubiert. Die DNA-Detektion erfolgte anschließend unter UV-Licht. Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mittels *Monarch DNA Gel Extraction Kit* (NEB) nach Herstellerangaben.

1x TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM

4.5.9 Restriktionsverdau

Der gezielte Restriktionsverdau von dsDNA-Fragmenten und DNA-Vektoren erfolgte mit spezifischen Restriktionsenzymen (NEB und Thermo Scientific). Ein Restriktionsansatz umfasste 50 µl, wobei ca. 500 ng dsDNA mit 1 µl Restriktionsenzym für 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Wenn zwei Restriktionsenzyme eingesetzt wurden, erfolgte der Verdau nacheinander, wobei das erste Restriktionsenzym hitzeinaktiviert oder der Restriktionsansatz mittels *Monarch PCR & DNA Cleanup Kit* (NEB) aufgereinigt wurde. Vektor-DNA wurde anschließend mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP, NEB) dephosphoryliert, wobei die freien 5'-Phosphatgruppen abgespalten werden und damit eine Religation verhindert wird. Die Dephosphorylierung erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Nach abgeschlossener Dephosphorylierung wurden die Ansätze nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

4.5.10 Ligation

Die Ligation von dsDNA-Fragmenten mit Vektor-DNA erfolgte mit *T4 DNA-Ligase* (Thermo Scientific) in Anwesenheit von ATP. Dabei wurde Insert-DNA und Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt und über Nacht bei 4 °C mit 5 Weiss-U *T4 DNA-Ligase* in einem Ansatz von 30 µl inkubiert.

4.5.11 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen und Elektrotransformation

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH5 α , W3110, AR388, BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) pLysS Rosetta und ET12567/pUZ8002 Zellen (s. Tabelle 2) wurde LB-Medium bzw. LBnoS-Medium (s. 4.3.1), ggf. supplementiert mit Antibiotika (s. 4.3.3), 1:100 mit einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes inokuliert und bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,5 bei 37°C schüttelnd inkubiert. *E. coli* HME68 und BW25113/pIJ790 Zellen (s. Tabelle 2) wurden bei 30°C inkubiert. Bei Ansätzen mit BW25113/pIJ790/SV2-B03 bzw. SV3-B05 wurde der Kultur zudem nach 1 h Inkubation 100 μ l 1% L-Arabinose zugegeben, um die Expression der λ -Red-Rekombinase zu induzieren. *E. coli* HME68 Zellen mit Cosmid SV2-B03 bzw. SV3-B05 (s. Tabelle 3) wurden für 15 Minuten in einem Wasserbad bei 42°C bei 200 rpm für 15 min inkubiert, um die λ -Red-Rekombinase zu induzieren. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt und für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zwei Mal mit sterilem ddH₂O (Volumen der Zellkultur) gewaschen und dann in 10% Glycerin (steril, 1:50 des Zellkulturvolumens) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet wieder in 10% Glycerin (steril, 1:500 des Zellkulturvolumens) resuspendiert und abschließend à 50 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation von DNA wurde ein Aliquot elektrokompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1- 2 μ l Plasmid-DNA (Klonierung) oder dsDNA (homologe Rekombination) versetzt. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm, VWR) überführt und die Transformation mittels Elektroporation bei 2500 V, 25 μ F und 200 Ω (*Gene Pulser Xcell*, Biorad) durchgeführt. Die elektroporierten Zellen wurden in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Reagenzröchen überführt und für 1 Stunde bei 37°C regeneriert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf Agarplatten, supplementiert mit geeigneten Antibiotika zur Selektion, ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Angewachsene Kolonien wurden anschließend per Kolonie-PCR (s. 4.5.5) analysiert.

4.5.12 TSS-Transformation

Eine weitere Methode für die Übertragung von Plasmid-DNA in einen *E. coli* Stamm war die TSS-Transformation (Chung, Niemela, and Miller 1989). Dabei wurde der zu transformierende Bakterienstamm in 2 ml LB-Medium (s. 4.3.1) angeimpft und bis zum Eintreten der exponentiellen Wachstumsphase bei 37°C rotierend kultiviert. Je Transformationsansatz wurden 200 μ l Bakterienkultur mit 200 μ l 2x TSS-Medium und 1-2 μ l Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis und anschließend 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Angewachsene Kolonien wurden anschließend per Kolonie-PCR (s. 4.5.5) analysiert.

2x TSS-Medium	PEG-6000	20%
	DMSO	10%
	Mg ₂ SO ₄	10 mM
	Gelöst in LB-Medium	

4.5.13 Generierung von chromosomalen Punktmutationen in *S. venezuelae*

Die Generierung von chromosomalen Punktmutationen in *S. venezuelae* erfolgte wie in (Feeney et al. 2017) beschrieben. Der genaue Ablauf ist in den folgenden Unterkapiteln 4.5.13.1 bis 4.5.13.3 aufgeführt.

4.5.13.1 Generierung spezifischer Oligonukleotide für die Einführung von Punktmutationen mittels homologer Rekombination

Für die Einführung von ALLEF- und AAA-Punktmutanten in den Cosmiden SV2-B03 und SV3-B05 wurden jeweils 70 bp lange Einzelstrang-Oligonukleotide generiert (s. Tabelle 7). Diese wurden so designt, dass sie komplementär zu den flankierenden Sequenzbereichen der zu mutierenden Sequenz waren und sich die ALLEF und AAA kodierenden Bereiche in der Mitte der jeweiligen Oligonukleotide befanden.

4.5.13.2 Einführung eines *origin of transfer (oriT)* in die Cosmide SV2-B03 und SV3-B05 durch λ -Red-vermittelte Rekombination

Um eine spätere Konjugation (s. 4.5.14) der Cosmide in *S. venezuelae* zu ermöglichen, musste zunächst ein *origin of transfer (oriT)* in die Cosmidsequenz eingebracht werden. Hierzu wurde die Kanamycin-Resistenzkassette (*neo*) in beiden Cosmiden mit einer Sequenzkassette (*apr-oriT*) ausgetauscht, welche ein Apramycinresistenzgen (*aac(3)/IV*) und die *origin of transfer* vermittelnde Sequenz (RK2) (Balzer, Pansegrau, and Lanka 1994) enthielt. Die *apr-oriT* Kassette wurde durch Oligonukleotide mit *neo*-spezifischen Überhängen (s. Tabelle 7) per PCR (s. 4.5.4) von pIJ773 (s. Tabelle 3) amplifiziert. Die λ -Red-vermittelte Rekombination erfolgte in *E. coli* BW25113/pIJ790 (s. Tabelle 2) nach vorheriger Transformation (s. 4.5.11) der Cosmide und der *apr-oriT* Kassette. Das Plasmid pIJ790 (s. Tabelle 3) enthält dabei die Gene für die λ -RED-Rekombinase induzierte Rekombination (Datsenko and Wanner 2000), welche zuvor wie in 4.5.11 beschrieben durch Zugabe von L-Arabinose induziert wurde. Die erfolgreiche Rekombination wurde durch Selektion auf Apramycinhaltigen LB-Agarplatten (s. 4.3.2 und 4.3.3) und mittels Kolonie-PCR (s. 4.5.5) getestet. SV3-B05 *kan::apr-oriT* und SV2-B03 *kan::apr-oriT* wurden anschließend in *E. coli* HME68 (s. Tabelle 2) transformiert.

4.5.13.3 Mutation der EAL –und GGDEF kodierenden Sequenzen in SV3-B05 *kan::apr-oriT* und SV2-B03 *kan::apr-oriT* und Konjugation in *S. venezuelae*

Die Mutation der EAL und GGDEF kodierenden Gensequenzen in SV3-B05_*kan::apr-oriT* und SV2-B03_*kan::apr-oriT* erfolgte in *E. coli* HME68 (s. Tabelle 2) durch λ -Red-vermittelte Rekombination. In *E. coli* HME68 ist das *methyl-directed mismatch repair* System (MMR) deletiert ($\Delta mutS$) (Thomason et al. 2014), was die Rekombinationseffizienz trotz Fehlbasenpaarungen steigert. Außerdem enthält der Stamm die λ -Red-Rekombinase kodierenden Gene, welche zuvor wie in 4.5.11 beschrieben durch einen Hitzeschock induziert wurden. Von den in 4.5.13.1 beschriebenen Einzelstrang-Oligonukleotiden wurde 1 μ l in kompetente *E. coli* HME68+SV3-B05-*kan::apr-oriT* bzw. *E. coli* HME68+SV2-B03-*kan::apr-oriT* transformiert. Nach 30 Minuten Regenerationszeit in LB-Medium (s. 4.3.1) bei 28°C wurden beide Transformationsansätze in einer Verdünnungsreihe in LB-Medium seriell bis 1:1000 verdünnt und jeweils 100 μ l der Verdünnung auf LB-Platten (s. 4.3.2), supplementiert mit Apramycin (s. 4.3.3), ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Je Stamm wurden 45 Kolonien gepickt und eine Kolonie-PCR (s. 4.5.5) mit spezifischen Oligonukleotiden (s. Tabelle 7) durchgeführt. Positive Kandidaten wurden erneut in Apramycin-haltigem LB-Medium kultiviert, die Cosmide isoliert und in *E. coli* W3110 Zellen transformiert (s. 4.5.11). Nach zwei Passagierschritten auf Apramycin-haltigem LB-Agar wurde *E. coli* W3110+SV2-B03-*kan::apr-oriT-rmdA^{AAA}* bzw. *E. coli* W3110+SV2-B03-*kan::apr-oriT-rmdA^{ALLEF}* und *E. coli* W3110+SV3-B05-*kan::apr-oriT-rmdB^{AAA}* erneut kultiviert und die Cosmide isoliert. Die gesamte Gensequenz von *rmdA* und *rmdB* wurde per PCR amplifiziert und zum Sequenzieren eingeschickt (s. 4.5.15). Positive Klone wurden in *S. venezuelae* konjugiert (s. 4.5.14 und Tabelle 2) und auf Apramycin-haltigem MYM-Medium (s. 4.3.1) selektiert. Nach zwei weiteren Passagierschritten auf apramycin- und naldixinsäurehaltigem DNA-Agar (s. 4.3.2 und s. 4.3.3) wurden die positiven Klone sechs Mal auf MYM-Agar ohne Selektionsmedium passagiert, um die Cosmide wieder zu entfernen. Im Anschluss wurden die Klone testweise wieder auf Apramycin-haltigem DNA-Agar passagiert und nur diejenigen Klone weitergeführt, welche nicht angewachsen waren. Von den positiven Klonen wurde daraufhin die genomische DNA isoliert (s. 4.5.2), die Gensequenz von *rmdA* bzw. *rmdB* per PCR amplifiziert (s. 4.5.4) und diese zum Sequenzieren (s. 4.5.15) eingeschickt. Von erfolgreich mutierten Stämmen wurden Sporensammlungen hergestellt (s. 4.4.5).

4.5.14 Konjugation in *Streptomyces venezuelae*

Konjugationen zwischen *E. coli* und *S. venezuelae* wurden wie in (Bibb et al. 2012) beschrieben durchgeführt. Das zu konjugierende Plasmid oder Cosmid wurde wie in 4.5.11 beschrieben in *E. coli* ET12567/pUZ8002 (s. Tabelle 2) transformiert und davon eine Übernachtskultur bei 37°C in LB-Medium bzw. LBnoS-Medium (s. 4.3.1), supplementiert mit

Kanamycin, Chloramphenicol und dem Selektionsantibiotikum des zu konjugierenden Vektors, angesetzt (s. 4.3.3). Die Hauptkultur wurde 1:20 mit Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,5 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 7000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zwei Mal in LBnoS-Medium (s. 4.3.1) gewaschen und anschließend in ca. 250 µl LBnoS-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 20 µl Sporen (1x10⁹ CFU/ml) des Rezipientenstammes versetzt. Der Konjugationsansatz wurde auf SFM-Platten (s. 4.3.2) ausplattiert und für ca. 17 Stunden bei RT inkubiert. Die SFM-Platten wurden anschließend mit 2 ml sterilem ddH₂O, 20 µl Nalidixinsäure (s. 4.3.3) und 20 µl Selektionsantibiotikum des konjugierten Vektors überschichtet. Die überschichteten SFM-Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Angewachsene *S. venezuelae* Kolonien wurden auf LB-Agarplatten bzw. DNA-Agarplatten (s. 4.3.2) passagiert, welche mit Nalidixinsäure und Selektionsantibiotikum des konjugierten Vektors supplementiert waren. Dieser Passagierschritt wurde wiederholt und anschließend die Zellen auf MYM-Agarplatten (s. 4.3.2) ausgestrichen. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Konjugation wurden hierbei *S. venezuelae* WT und bei Komplementationen der zu komplementierende Stamm als Vergleich ausgestrichen. Augenscheinlich positive Klone wurden anschließend zur Herstellung eines Sporenstocks (s. 4.4.5) auf MYM-Agarplatten ausgestrichen und ggf. durch Sequenzieren (s. 4.5.15) isolierter gDNA (s. 4.5.2) auf Richtigkeit untersucht.

4.5.15 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Amplifikaten und Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma *LGC Genomics GmbH* mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger and Coulson 1975).

4.5.16 DNA-Sequenzdesign und DNA-Sequenzvergleiche

Oligonukleotide (s. Tabelle 7) und DNA-Konstrukte (s. Tabelle 3) wurden *in silico* mit Hilfe der Software *Serial Cloner* (Serialbasics) erstellt und organisiert. DNA-Sequenzvergleiche z.B. nach Sequenzierungen wurden mit dem Online-Tool *BLASTn* (NCBI) durchgeführt. Für die Durchführung von multiplen Sequenzvergleichen wurde die Online-Funktion *ClustalOmega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) genutzt. Gensequenzen von *S. venezuelae* wurden mit Hilfe der Online-Datenbank *StrepDB* (<http://strepdb.Streptomyces.org.uk/>) identifiziert.

4.5.17 Nukleotidextraktion

S. venezuelae Stämme wurden in 100 ml MYM-Medium (s. 4.3.1) oder als Makrokolonien (s. 4.8.2) auf MYM-Agar (s. 4.3.2) kultiviert. Alle Experimente wurden als biologische Triplikate durchgeführt. Abhängig vom Zeitpunkt der Ernte von Makrokolonien bestand ein Replikat aus

4-8 Makrokolonien. Proben aus MYM-Flüssigkultur wurden alle 2 Stunden im Zeitraum von 8 – 20 Stunden nach Start der Kultivierung entnommen. Dabei wurden 5 ml Zellkultur für die spätere Nukleotidextraktion und zwei Mal 1 ml Zellkultur für die Proteinbestimmung abgenommen und zentrifugiert. Auf MYM-Agar gewachsene Makrokolonien wurden zu den Zeitpunkten 30, 48 und 96 Stunden nach Start der Kultivierung von der Agarplatte abgenommen. Anschließend wurden die Zellpellets gewogen, um das Nasszellgewicht zu bestimmen. Alle Proben für die Nukleotidextraktion wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Proben für die Proteinbestimmung wurden bei -20°C gelagert.

Die Nukleotidextraktion erfolgte wie in (Gundlach et al. 2015) beschrieben und wurde an die Ansprüche von *Streptomyces* angepasst. Alle Proben für die Nukleotidextraktion wurden in 800 µl *Extraction Mixture II* resuspendiert und in Schraubdeckelröhrchen mit vorgelegten Zirkonia-Kügelchen (*Lysing Matrix B*, MP Biomedicals) überführt. Vor dem Homogenisierungsschritt wurden die Proben für 15 Sekunden in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Homogenisierung erfolgte mittels starken Schüttelns der Zirkonia-Kügelchen in einer *FastPrep-24™ 5G* Apparatur (MP Biomedicals). Dabei wurden fünf Zyklen à 30 Sekunden Schütteln (6 m/s) und 1 Minute Pause bei 4 °C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten bei 4°C max. rpm zentrifugiert und der Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die verbliebenen Zellpellets wurden in 600 µl *Extraction Mixture I* resuspendiert und der Homogenisierungsschritt wie oben beschrieben wiederholt. Die Extraktion in 600 µl *Extraction Mixture I* wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Die gesammelten Überstände (ca. 2 ml) wurden vereinigt und über Nacht bei -20°C gelagert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Präzipitationsschritt wurde zwei Mal wiederholt. Anschließend wurden die Proben mittels einer *SpeedVac Plus SC110A* Apparatur (Savant) bei 45°C getrocknet. Die Proben wurden wie in (Gundlach et al. 2015) beschrieben per LC-MS/MS analysiert.

Die Proben für die Proteinbestimmung wurden in 800 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und in 2 ml Schraubdeckelröhrchen mit Zirkonia-Kügelchen überführt (0,1 mm *Silica Beads*, Biozym). Die Proben wurden für 10 Minuten auf 98°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Die Homogenisierung erfolgte mittels starken Schüttelns der Zirkonia-Kügelchen in einer *FastPrep-24™ 5G* Apparatur (MP Biomedicals). Dabei wurden fünf Zyklen à 30 Sekunden Schütteln (6 m/s) und 1 Minute Pause bei 4 °C durchgeführt. Die Zellysate wurden für 15 Minuten bei 4 °C und max. rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und der Homogenisierungsschritt wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und die

Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 4.7.7) ermittelt.

Für die Normalisierung der Nukleotidkonzentration auf die Gesamtproteinkonzentration wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{X [nM] \cdot 200 \mu l}{cV [ml] \cdot c590 \left[\frac{\mu g}{ml \text{ Zellen}} \right]} = \frac{X [pmol]}{Protein [mg]}$$

Bei der Nukleotidextraktion aus Makrokolonien wurden die Nukleotidkonzentrationen auf das Nasszellgewicht normalisiert.

Verwendete Lösungen:

Extraction mixture I	Methanol / Acetonitril (1:1)
Extraction mixture II	Methanol / Acetonitril / Wasser (2:2:1)

4.5.18 DNA-Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Synthese der DNA-Oligonukleotide erfolgte durch die Firma *Metabion International AG*.

Tabelle 7: DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz
Oligonukleotide für die Konstruktion von pKT25-rmdA	
PRJH1	ATAtctagagGTGAAGGTCCCGTCGCAG
PRJH2	ATAgattcTCAGACGGCGTCCGCCAG
Oligonukleotide für die Konstruktion von pKNT25-rmdA und pUT18-rmdA	
PRJH3	ATAaagcttgGTGAAGGTCCCGTCGCAG
PRJH4	ATAgattcgaGACGGCGTCCGCCAG
Oligonukleotide für die Konstruktion von pKT25-rmdB, pKNT25-rmdB sowie pUT18-rmdB und pUT18C-rmdB	
PRJH5	ATAATAtctagagTCCACCCTGTGGATCGCC
PRJH6	ATAATAggtaccgCTGGACGACCTGGCCGG

Oligonukleotide für die Konstruktion von p3xFLAG-rmdA	
PRJH7	GATCAAGCTTCAACGCGCGGGATTTCGC
PRJH8	GCAGCCTCGAGGACGGCGTCCGCCAG
Oligonukleotide für die Konstruktion von pSS172-rmdA	
PRJH7	GATCAAGCTTCAACGCGCGGGATTTCGC
PRJH20	GCAGCcctaggGACGGCGTCCGCCAG
Oligonukleotide für die Konstruktion von p3xFLAG-rmdB und pSS172-rmdB	
PRJH9	GCTGCATATGCTCCCGGCCCCCTCG
PRJH10	CATGCCTAGGCTGGACGACCTGGCCG
Oligonukleotide für die Konstruktion von pET15b-rmdB	
PRJH11	ATACATATGTCCACCCTGTGGATCGC
PRJH12	ATAGGATCCCTACTGGACGACCTGGC
Oligonukleotide für die Konstruktion von pET15b-rmdB^{GGDEF}	
PRJH11	ATACATATGTCCACCCTGTGGATCGC
PRJH14	ATAGGATCCCTAGGTGTTGGAGTCGCGC
Oligonukleotide für die Konstruktion von pET15b-rmdB^{EAL}	
PRJH13	ATACATATGCGCGACTCCAACACCC
PRJH12	ATAGGATCCCTACTGGACGACCTGGC
Oligonukleotide für die Konstruktion von pMAL-c2-rmdA	
PRJH15	TATATGAATTCAGCCGCTTCCGCGCGGTCTT
PRJH16	TATAAAGCTTGTGACGACGGCGTCCGCCAGCA
Oligonukleotide für die Amplifikation der <i>oriT-apr</i> Cassette mit <i>neo</i>-spezifischen Überhängen für den Austausch der <i>kan^R</i> Cassette in Cosmid SV2-B03 und SV3-B05 sowie für die PCR-Verifikation des Austausches	
neo_H1-P1-fw	AGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGatgATTCCGG

	GGATCCGTCGACC
neo_H2-P2-rev	TCGCTTGGTCGGTCATTTCGAACCCAGAGTCCCGCtcaTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
neo_test-fw	GTTTTATGGACAGCAAGCG
neo_test-rev	GAATCGAAATCTCGTGATG
Oligonukleotide für die Konstruktion einer <i>rmdA</i>^{ALLEF} Punktmutation in SV2-B03, Test-PCR zur Verifikation und für die anschließende Sequenzierung	
PRJH17	ACCGGCTCCGGCGAGATGGTCGCCCCGGCTCgcactgctgGAGTTCGT CGCCCTCACCACCGGCGCCGCCG
Sequenzierungs Oligonukleotid rmdA_ALLEF	TGCTGCACCTGCGCCTGCGG
Test-PCR Oligonukleotid rmdA_ALLEF_fw	GTCGCCCCGGCTCgcactgctg
Test-PCR Oligonukleotid rmdA_ALLEF_rw_new	TCAGACGGCGTCCGCCAGCAG
Oligonukleotide für die Konstruktion einer <i>rmdA</i>^{AAA} Punktmutation in SV2-B03, Test-PCR zur Verifikation und für die anschließende Sequenzierung	
PRJH18	GCACGCCGTGCTGCGGGTGGCACCACCGGACggcgggcggcGGCGC CGTGCACTGCGTTCGTCGAGGTG
Sequenzierungs Oligonukleotid rmdA_AAA	CTGACCGTCCGCGGCAGCC
Test-PCR Oligonukleotid rmdA_AAA_fw_new	CGGCGCCggcgccgccc
Test-PCR Oligonukleotid rmdA_AAA_rw_new	TCAGACGGCGTCCGCCAGCAG

Oligonukleotide für die Konstruktion einer <i>rmdB</i>^{AAA} Punktmutation in SV3-B05, Test-PCR zur Verifikation und für die anschließende Sequenzierung	
PRJH19	GGTCCAGTTCGACGGCCAGGTCGCCGGCCTCgcccgggccGTCCGC TGGGTCCACCCCGAGCGCGGCAAG
Sequenzierungs Oligonukleotid <i>rmdB</i> _AAA	CTCCACCACCAGCGCCCAGC
Test-PCR Oligonukleotid <i>rmdB</i> _AAA_fw_new	CCGGCCTCgcccgggcc
Test-PCR Oligonukleotid <i>rmdB</i> _AAA_rw_new	CTACTGGACGACCTGGCCGGAG
Oligonukleotide zum Amplifizieren der Promotorregion von <i>rmdA</i>	
PRJH21	AAGCGCGGCGCG
PRJH22	GACGCTCCATCGATGTCTCCAA
Oligonukleotide zum Amplifizieren der Promotorregion von <i>rmdB</i>	
PRJH9	GCTGCATATGCTCCCGGCCCCCTCG
PRJH23	TCGGTTCCATTTCCGTCCCTCTCAC
Oligonukleotide für die Konstruktion von pMAL-c2-<i>rmdA</i>^{GGAFF} (Konstruiert durch Ortspezifische-Mutagenese basierend auf pMAL-c2-<i>rmdA</i>)	
PRJH26	CCCGGCTCGGCGGCGcCGccTTCGTCGCCCTCACC
PRJH27	CGACCATCTCGCCGGAGCCGG
Oligonukleotide für die Konstruktion von pGEX-<i>rmdB</i>	
PRJH28	GCTGggatccggCTCCACCCTGTGGATCGCCC
PRJH29	CATGccccgggCTACTGGACGACCTGGCCGG
Oligonukleotide für die Konstruktion von pUT18C-<i>rmdB</i>-<i>rsiG</i> (Konstruiert mittels <i>Gibson-Assembly</i>)	

PRJH30	gctcgctgaCTAAGTAATATGGTGCACTC
PRJH31	gtgccagctgTTATATCGATGAATTCGAGC
PRJH32	atcgatataaCAGCTGGCACGACAGGTTTC
PRJH33	gtgcactcatAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC
PRJH34	ggaaacagctATGAGTGCACCTGGCACC
PRJH35	tattacttagTCAGGCGAGCAGGTCGTC
Oligonukleotide für die Konstruktion von p3xFLAG-rmdB^{GGAFF} (Konstruiert durch Ortspezifische-Mutagenese basierend auf p3xFLAG-rmdB)	
PRJH36	CCCGGCTCGGCGGCGcCGccTTCGCCGTCCTGCTG
PRJH37	CGGCCTCGGCGCCGCGGGG
Oligonukleotide welche für qRT-PCR Experimente eingesetzt wurden	
hrdBqRT_F1	TGTTCTGCGCAGCCTCAATC
hrdBqRT_R1	CTCTTCGCTGCGACGCTCTT
BldM_fw	ATGACATCCGTTCTCGTCTGc
BldM_rw	AGGACTTCCTCGCCGTTGG
BldN_fw	ACTTCAAGTCCAGCCGGTTC
BldN_rw	TTGGAGAGGGACTCCAGGAC
chpC_qRT-PCR fw	AACGGTGCGGCCATGAATTC
chpC_qRT-PCR rev	CGACGACATTGACCGTGTTTC
chpE_qRT-PCR fw	CGTCCCCGTGAACGTCTC
chpE_qRT-PCR rev	CCGTTGAGGGCGTGTTG
chpH_qRT-PCR fw	AAGAAGGTCGTCGCTGCTG
chpH_qRT-PCR rev	GGACGACATTGCCCGAGAG

4.6 RNA-basierende Methoden

4.6.1 Isolation der Gesamt-RNA aus *S. venezuelae* Makrokolonien

Um die Gesamt-RNA aus *S. venezuelae* Makrokolonien zu isolieren, wurde diese wie in 4.8.2 beschrieben generiert und für 30 Stunden bei 30°C kultiviert. Von jedem Stamm wurde ein Duplikat, bestehend aus je 3 Kolonien, in 250 µl eiskalter RNase-Stopplösung aufgenommen und für 10 Minuten bei max. rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 700 µl RLA-Puffer (Bestandteil des *SV Total RNA Isolation Kit*, Promega) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut und 350 µl in Schraubdeckelröhrchen mit vorgelegten Zirkonia-Kügelchen (*Lysing Matrix B*, MP Biomedicals) überführt. Die restlichen 350 µl Zellsuspension wurden als Reserve für spätere RNA-Extraktionen bei -80°C eingelagert. Die überführte Zellsuspension wurde mit 352 µl Phenol (pH 4,3; Roth) und 88 µl Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1, AppliChem) versetzt. Der Aufschluss erfolgte mittels starken Schüttelns der Zirkonia-Kügelchen in einer *FastPrep-24™ 5G Apparatur* (MP Biomedicals). Dabei wurden fünf Zyklen à 30 Sekunden Schütteln (6 m/s) und 1 Minute Pause bei 4 °C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten bei 4°C und max. rpm abzentrifugiert und anschließend die wässrige Phase in ein 2 ml Reagiergefäß überführt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Eventuell vorhandene Phenol-Reste wurden entfernt und die RNA-haltige Lösung nach Herstellerangaben des *SV Total RNA Isolation Kit* (Promega) weiter behandelt und die Volumina entsprechend angepasst. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte durch Zugabe von 100 µl RNase-freiem ddH₂O (Bestandteil des Kits). Das Eluat wurde in 25 µl Volumina aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

RNase-Stopplösung	5 % Phenol in Ethanol
--------------------------	-----------------------

4.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA-Proben mittels Spektrophotometer

Die Ermittlung der Konzentration von RNA-Proben erfolgte wie in 4.5.3 beschrieben. Anhand des Verhältnisses OD₂₆₀/OD₂₈₀, welches bei reiner RNA bei 2 liegt, konnte zudem der Reinheitsgrad der Proben bestimmt werden. Während OD₂₆₀/OD₂₈₀-Werte um 1,8 auf eine Kontamination mit DNA hindeuten, sprechen signifikant kleinerer Werte als 1,8 für eine Kontamination der Proben mit Phenol oder Proteinen.

4.6.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA-Proben mittels automatisierter Elektrophorese

Eine genaue Ermittlung der Konzentration, Integrität und Reinheit von RNA-Proben erfolgte mittels automatisierter Elektrophorese in der *2100 Bioanalyzer Instrument* Apparatur (Agilent) und dem *RNA 6000 Nano Kit* (Agilent). Die Analyse der RNA-Proben erfolgte nach Herstellerangaben.

4.6.4 DNase I Verdau von RNA-Proben

Um DNA-Kontaminationen in RNA-Proben zu entfernen, wurden die RNA-Proben einem DNase I Verdau mittels des Kits *TURBO DNA-free* (Ambion) nach Herstellerangaben unterzogen.

4.6.5 Sequenzierung der Gesamt-RNA und Erstellung einer Transkriptomanalyse

RNA-Proben wurden zur weiteren Bearbeitung an die Firma *vertis Biotechnologie AG* übergeben, welche eine rRNA-Depletion und die RNA-Sequenzierung durchführten. Die Proben wurden, nach erfolgreicher rRNA-Depletion mittels *Ribo-Zero rRNA Removal Kit for Bacteria* (Illumina) und Ligation eines Adapter-Oligonukleotids mit integriertem Barcode, in cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden vereinigt, größenfraktioniert und mit einem *Illumina NextSeq 500 System* in 75 bp Leselängen sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung und die auf der RNA-Sequenzierung basierenden Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit der *University of California* (San Diego) durchgeführt und ist in (Haist et al. 2020) beschrieben.

4.6.6 qRT-PCR zur Validierung der Transkriptomanalyse

Um die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zu validieren, wurde die Expression einiger Gene per qRT-PCR untersucht. Als Zielgene für die qRT-PCR wurden *bldM*, *bldN*, *chpC*, *chpE* und *chpH* bestimmt. Das konstitutiv exprimierte Gen *hrdB* wurde wie in (Bush et al. 2017) beschrieben als Standard für die spätere Normalisierung genutzt.

4.6.6.1 Generierung von RNA-Proben für den Einsatz in der qRT-PCR

Als Ausgangsmaterial wurde die Gesamt-RNA aus denselben Zellproben isoliert, welche auch schon für die RNA-Isolation für die RNA-Sequenzierung genutzt und für diesen Fall aliquotiert wurden (s. 4.6.1). Die RNA-Isolation wurde wie in 4.6.1 beschrieben durchgeführt und die eluierten RNA-Proben einem zusätzlichen DNaseI-Verdau unterzogen (s. 4.6.4). Die Konzentration der RNA-Proben wurde wie in 4.6.2 beschrieben per Spektrophotometer bestimmt. Um auszuschließen, dass die RNA-Proben mit DNA kontaminiert waren, wurden diese in einer Standard-PCR (s. 4.5.4) mit *hrdB*-Oligonukleotiden (s. Tabelle 7) eingesetzt und

das PCR-Produkt per Agarosegelelektrophorese und anschließender DNA-Färbung (s. 4.5.8) analysiert.

4.6.6.2 Design von qRT-PCR Oligonukleotiden und Bestimmung deren Bindungseffizienz

Die Oligonukleotide für die qRT-PCR (s. Tabelle 7) wurden mit Hilfe des Online-Tools *Primer3* entworfen. Für jedes Oligonukleotid-Paar wurde die Bindungseffizienz (E) mit Hilfe von *S. venezuelae* gDNA (s. 4.5.2) ermittelt. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen an gDNA (10-0,001 ng) in der qRT-PCR (s. 4.6.6.3) eingesetzt und die ermittelten *cycle threshold*-Werte (C_T -Werte) für die graphische Erstellung einer Kurve genutzt. Eine lineare Regressionsgerade wurde erstellt und deren Steigung (m) ermittelt. Mit folgender Formel konnte die jeweilige Bindungseffizienz (E) bestimmt werden:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Außerdem wurde mit Hilfe einer Schmelzkurve überprüft, dass nur ein PCR-Produkt amplifiziert wird.

4.6.6.3 qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des Kits *SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit* (Bioline) und der *CFX Connect real time system* Apparatur (Bio-Rad) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden 20 ng RNA eingesetzt. Für jedes Oligonukleotid-Paar (s. Tabelle 7) wurden Kontrollen mitgeführt, bei welchen RNA durch DEPC-H₂O ersetzt wurde. Die qRT-PCR-Ansätze und das verwendete qPCR-Programm sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 beschrieben.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes

Bestandteil	Volumen in µl
2x SensiFAST SYBR Puffer	5
FW-Oligonukleotid	0,4
RW- Oligonukleotid	0,4
Reverse-Transkriptase	0,1
RNase Inhibitor	0,2
DEPC-H ₂ O	1,9
RNA	2

Gesamtvolumen	10
----------------------	-----------

Tabelle 9: Verwendetes qRT-PCR-Programm

Zyklenzahl	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	45	20:00
1	95	05:00
34	95	00:10
	60	00:20
	72	00:10
1	72	10:00
Schmelzkurve	58-99 °C in 0,5 °C Schritten	Je 00:05

Die qRT-PCR-Ansätze wurden in *96-well multiplate PCR plates* (BioRad) pipettiert und diese mit Folie (*microseal `B` seal seals*, Bio-Rad) verschlossen.

4.6.6.4 Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse

Alle qRT-PCR-Ansätze wurden als Triplikat durchgeführt und jedes qRT-PCR-Experiment drei Mal wiederholt. Die resultierenden C_t -Werte wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die komparative Quantifizierung der qRT-PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe der Standard-Kurven-Methode berechnet. Folgende Formeln wurden zur Berechnung eingesetzt:

$$Fold\ Difference = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta C_t\ Zielgen}}{(E_{Normalisierungsgen})^{\Delta C_t\ Normalisierungsgen}}$$

$$\Delta C_t\ Zielgen = C_t\ Zielgen\ c - C_t\ Zielgen\ s$$

$$\Delta C_t\ Normalisierungsgen = C_t\ Normalisierungsgen\ c - C_t\ Normalisierungsgen\ s$$

Die *Fold Difference* Werte wurden mittels der Software *Office Excel* (Microsoft) in *log2Fold-Difference* umgerechnet.

4.7 Protein-basierte Methoden

4.7.1 Überproduktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Die Generierung von rekombinanten Proteinen erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS oder *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Rosetta (s. Tabelle 2). *E. coli* BL21 (DE3) fehlen die Proteasen OmpT und Lon, wodurch sich dieser Stamm für die Überproduktion von Proteinen eignet. Der Stamm Rosetta weist durch das Plasmid pRARE auch Kodons auf, welche in *E. coli* gering exprimiert werden. Die Induktion der Expression aller verwendeten Überexpressionsplasmide (s. Tabelle 3) erfolgte durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). IPTG inaktiviert den Lac-Repressor LacO, wodurch sich dieser von der Lac-Operatorsequenz in der Promotorregion löst und die Anlagerung der RNA-Polymerase an die Promotor-Region erlaubt und somit die Transkription des Zielgens ermöglicht. Bei der Verwendung des Überexpressionsplasmids pET15b wird durch die Zugabe von IPTG auch die Expression der, in *E. coli* BL21 (DE3) chromosomal kodierten, T7-RNA Polymerase induziert. In diesem Falle wurde zusätzlich das Plasmid pLysS mitgeführt, welches konstitutiv die Expression von T7-Lysozym ermöglicht und der geringen Autoexpression der T7-RNA Polymerase vor der Induktion entgegenwirkt.

Die Hauptkultur zur Generierung von rekombinanten Proteinen erfolgte in 1 L LB-Medium (s. 4.3.1), supplementiert mit geeigneten Antibiotika (s. 4.3.3) zur Selektion, und wurde durch Inokulieren mit Übernachtskultur (1:100) gestartet. Bei der Verwendung des Überexpressionsplasmids pMAL-c2 (s. Tabelle 3) wurde das LB-Medium zusätzlich mit 0,2 % Glucose supplementiert, um die Expression von Amylase zu unterbinden. Die Inkubation erfolgte zunächst bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,5. Eine Ausnahme stellt die Expression von pIJ10914 (s. Tabelle 3) dar, bei welcher die Kultur bei 30°C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,5 inkubiert wurde. Die Kultur wurde mit 100-300 μ M IPTG und ggf. 350 μ M MnCl₂ oder 350 μ M MgCl₂ supplementiert und je nach Protein weitere 2 Stunden bei 37°C, 4 Stunden bei 30°C oder über Nacht bei 16°C schüttelnd (150 rpm) inkubiert.

4.7.2 Zellernte und Zellaufschluss aus *E. coli* Zellen

Die Bakterienkultur wurde für 15 Minuten bei 7000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 15-25 ml geeignetem Resuspensionspuffer unter Zugabe einer Tablette Protease-Inhibitor (PI, cOmplete™ Mini EDTA-frei, Roche) resuspendiert. Wenn der Zellaufschluss nicht sofort erfolgte, wurde die Zellsuspension bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Folgende Resuspensionspuffer wurden eingesetzt:

Resuspensionspuffer für nachfolgende Ni-NTA Säulenchromatografie

50 mM Tris, pH 8
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
1 mM β -Mercaptoethanol
10% Glycerin
0,1 % Triton X-100

Resuspensionspuffer für nachfolgende Amylose Säulenchromatografie

50 mM Tris, pH 7,5
300 mM NaCl
10 mM MnCl_2
1 mM β -Mercaptoethanol
10% Glycerin

Resuspensionspuffer für nachfolgende Glutathion-Sepharose Säulenchromatografie

140 mM NaCl
10 mM Na_2HPO_4
2,7 mM KCl
1,8 mM KH_2PO_4

Der Zellaufschluss für Zellkulturen aus Ansätzen über 100 ml erfolgte mittels Hochdruckaufschlussverfahren (*HTU Digi French Press*, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik GmbH) bei ca. 18.000 psi. Das Aufschlussverfahren wurde vier Mal wiederholt und das Zelllysate anschließend für 45 Minuten bei 16.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der so generierte Überstand wurde für die nachfolgende Affinitätschromatografie eingesetzt.

Bei geringen Zellkulturvolumina (bis 100 ml) wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung lysiert. Dabei wurden die Zellpellets in geeignetem Resuspensionspuffer unter Zugabe einer Tablette Protease-Inhibitor (PI, *cOmplete Mini EDTA-frei*, Roche) resuspendiert und der Aufschluss durch Ultraschall-Impulse (2x30 Sekunden á 1,5 Sekunden Ultraschall und 1 Sekunde Pause) durchgeführt. Dabei wurde die Zellsuspension mittels Eis gekühlt.

4.7.3 Proteinreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatografie

Für die Reinigung über Ni-NTA Affinitätschromatografie mussten die zu isolierenden Proteine zunächst mit einem His₆-Affinitätsmarker fusioniert werden. Dies erfolgte in dieser Arbeit durch die Klonierung der kodierenden Gensequenz in den Expressionsvektor pET15b (s. Tabelle 3), welcher eine N-terminale Fusion des His₆-Affinitätsmarkers ermöglicht. Das Prinzip der Ni-NTA Affinitätschromatografie liegt in der Komplexbildung von zwei Imidazolringen, gegeben durch den His₆-Affinitätsmarker, mit dem zweiwertigen Metallion Ni²⁺. Ni ist dabei selbst durch Nitrilotriessigsäure an einer Agarosematrix immobilisiert. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch Zugabe von Imidazol. Das wie in 4.7.2 beschrieben hergestellte Zelllysate wurde über Nacht in 0,5 – 1 ml Ni-NTA Agarose bei 4°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Suspension wurde auf eine 20 ml Säule geladen und anschließend mit 150 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 5 ml Elutionspuffer in 1 ml Schritten.

Verwendete Puffer:

Waschpuffer	50 mM Tris, pH 8
	300 mM NaCl
	50 mM Imidazol
	1 mM β-Mercaptoethanol
	10% Glycerin
	0,1 % Triton X-100
Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8
	300 mM NaCl
	250 mM Imidazol
	1 mM β-Mercaptoethanol
	10% Glycerin
	5 mM MgCl ₂

4.7.4 Proteinreinigung über Amylose-Affinitätschromatografie

Das Prinzip hinter der Amylose-Affinitätschromatografie liegt in der Affinität zwischen Amylose und dem Maltosebindepotein (MbP) MalE. Für die Fusion des Zielproteins mit einem MbP-Affinitätsmarker wurde in dieser Arbeit die jeweils kodierende Gensequenz in den

Expressionsvektor pMAL-c2 (s. Tabelle 3) kloniert. pMAL-c2 ermöglicht eine N-terminale Fusion des MbP-Affinitätsmarkers an das Zielgen.

Das wie in 4.7.2 beschrieben generierte Zelllysate wurde mit 1,5 ml Amylose-Matrix (NEB) versetzt und nach einstündiger Inkubation bei 4°C auf eine 20 ml Säule überführt. Die Affinitätsmatrix wurde mit 200 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend gebundenes Protein mittels Zugabe von 8 ml Elutionspuffer in 1 ml Schritten eluiert.

Verwendete Puffer:

Waschpuffer	50 mM Tris, pH 7,5
	300 mM NaCl
	10 mM MnCl ₂
	1 mM β -Mercaptoethanol
	10% Glycerin
Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 7,5
	300 mM NaCl
	10 mM Maltose
	10 mM MnCl ₂
	1 mM β -Mercaptoethanol
	10% Glycerin

4.7.5 Proteinreinigung über Glutathion-Affinitätschromatografie

In pGEX-6P-1 (s. Tabelle 3) exprimierte rekombinante Proteine sind am N-Terminus mit der Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. GST weist eine hohe Affinität zu ihrem Substrat Glutathion auf, wodurch sich fusionierte Proteine mittels Glutathion-Affinitätschromatografie isolieren lassen. Das wie in 4.7.2 beschrieben generierte Zelllysate wurde mit 1 ml Glutathion-Sepharose (GE Healthcare) versetzt und nach einstündiger Inkubation bei 4°C auf eine 20 ml Säule überführt. Die Suspension wurde mit 100 ml Waschpuffer gewaschen, gefolgt von einem Waschriss mit 40 ml 1x PBS. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 2,5 ml Elutionspuffer in 0,5 ml Schritten.

Verwendete Puffer:

Waschpuffer	50 mM Tris, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8
	10 mM reduziertes Glutathion
	1 mM DTT

4.7.6 Pufferaustausch und Dialyse

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Dialysemembranen dialysiert und dabei gleichzeitig ein Pufferaustausch durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinlösung in einen Dialysemembranschlauch (*Standard RC Tubing*, Spectrum Laboratories) überführt und für 1 Stunde bei 4 °C in Dialysepuffer inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung bei 14500 rpm zentrifugiert, erneut in einen Dialysemembranschlauch überführt und über Nacht bei 4°C in Dialysepuffer inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 14500 rpm wurde die Proteinlösung à 200 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Verwendeter Dialyse Puffer:

Dialysepuffer	50 mM Tris, pH 7,5
	250 mM NaCl
	10 mM MnCl ₂ oder MgCl ₂
	1 mM β-Mercaptoethanol
	10% Glycerin

4.7.7 Zellaufschluss von *S. venezuelae* durch Homogenisierung

Der Aufschluss von *S. venezuelae* Zellmaterial erfolgte durch Homogenisierung mittels starken Schüttelns in einer *FastPrep-24™ 5G* Apparatur (MP Biomedicals). Dabei wurde das Zellmaterial mit Zirkonia-Kügelchen (0,1 mm *Silica Beads*, Biozym) oder *Lysing Matrix B* (MP Biomedicals) versetzt und mittels fünf Zyklen à 30 Sekunden Schütteln (6 m/s) und 1 Minute Pause bei 4 °C homogenisiert.

4.7.8 Zellaufschluss von *S. venezuelae* durch Hochdruckverfahren

Ein weiterer Ansatz zum Zellaufschluss von *S. venezuelae* aus Flüssigkultur war das Hochdruckaufschlussverfahren (*HTU Digi French Press*, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik GmbH) bei ca. 18.000 psi. Dazu wurden geerntet Zellpellets in 1x PBS mit Protease-Inhibitor (PI, *cOmplete Mini EDTA-frei*, Roche) resuspendiert und das Aufschlussverfahren vier Mal wiederholt.

4.7.9 Auftrennung von Zelllysat in Zellmembran- und zytosolische Fraktion

Um Zelllysate in Zellmembran- und zytosolische Fraktion zu trennen, wurde dieses mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellmembranfraktion beinhaltende Pellet wurde zwei Mal mit 1x PBS mit Protease-Inhibitor (PI, *cOmplete Mini EDTA-frei*, Roche) gewaschen. Um verbliebene zytosolische Proteine zu entfernen, wurde das gewaschene Zellpellet in 100 mM Na₂CO₃ resuspendiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und der gesamte Prozess drei Mal durchlaufen, wobei bei jedem Durchgang ein Aliquot vom Überstand entnommen wurde (Zytosolischefraktion). Die Membranfraktion wurde in 100 µl 1x PBS mit Protease-Inhibitor (PI, *cOmplete Mini EDTA-frei*, Roche) resuspendiert und die Proteinkonzentration nach Bradford (s. 4.7.10) durchgeführt. 20 µg Gesamtprotein wurden per SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennt und per Western Blot (s. 4.7.16) auf PVDF-Membran übertragen.

4.7.10 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf der Komplexbildung von kationischen und ungeladenen Aminosäureseitenketten mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G-250. Durch die Komplexbildung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595 nm verschoben und kann mittels Spektrophotometer gemessen werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde *Roti-Nanoquant* (Roth) nach Herstellerangaben in 96-well Platten eingesetzt. Zur exakten Proteinbestimmung musste jeder Ansatz kalibriert werden. Hierzu wurde eine Eichgerade mit *Roti-Nanoquant* und *Albumin Standard* (Thermo) erstellt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Einsetzen der ermittelten Werte in die Formel der Eichgerade unter Berücksichtigung eventueller Verdünnungen.

4.7.11 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE und Calibration-Kit

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einzelner, mittels SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennter, Proteinbanden wurde das *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare) nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Kit umfasst einen

Größenstandard mit Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts in spezifischen Konzentrationen. Die zu analysierende Proteinlösung wurde in Volumina von 0,5-2 µl, versetzt mit 4x SDS-Ladepuffer zu einem Endvolumen von 5 µl, per SDS-PAGE aufgetrennt und dabei der Größenstandard in Volumina von 2-5 µl mitgeführt. Das SDS-Gel wurde mittels Coomassie-Brilliant-Blue G-250 angefärbt (s. 4.7.14) und per CCD-Kamera (*Image-Quant LAS4000*, GE Healthcare) fotografiert. Die Auswertung erfolgte durch die Software *Image Quant TL* (GE Healthcare) nach Protokoll des Herstellers.

4.7.12 Konzentration von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von *VIVASPIN* Ultrafiltrations-Zentrifugationsröhrchen (Satorius) nach Herstellerangaben ankonzentriert. In dieser Arbeit wurden *VIVASPIN* Ultrafiltrations-Zentrifugationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10 und 30 kDa benutzt.

4.7.13 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die diskontinuierliche, denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und überlagert zugleich deren Eigenladungen durch gleichmäßige Anlagerung an das Protein, wobei ein SDS-Protein-Komplex ein annähernd konstantes Ladung-zu-Masse-Verhältnis aufweist. Dies erlaubt eine Auftrennung nach Molekülmasse, da große Proteine im porösen Polyacrylamid-Gel stärker zurückgehalten werden als kleine. In dieser Arbeit wurden Polyacrylamid-Gele mit einer Konzentration von 10-17% eingesetzt (s. Tabelle 10) und die Gelelektrophorese in Vertikalkammern (*Mini Trans-Blot Cell*, BioRad) durchgeführt. Pro Probenflasche wurden 5-20 µl Proteinlösung, aufgenommen in 1-4x SDS-Probenpuffer, aufgetragen und bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der *Color Prestained Protein Standard* (NEB) mitgeführt. Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die SDS-Gele mittels Coomassie-Färbung (s. 4.7.14) oder Silberfärbung (s. 4.7.15) gefärbt oder in Western Blot Experimenten (s. 4.7.16) eingesetzt.

Verwendete Puffer:

4x SDS-Ladepuffer	240 mM Tris, pH 6,8
	8% SDS
	12% β-Mercaptoethanol
	40% Glycerin

0,02% Bromphenolblau

1x SDS-Ladepuffer	4x SDS-Ladepuffer wurde 1:3 in ddH ₂ O verdünnt.
SDS-Sammelgelpuffer	6,06 g TRIS 0,4 % SDS Ad 100 ml H ₂ O pH 6,8 mit HCl
SDS-Trenngelpuffer	36,34 g TRIS 0,4 % SDS Ad 200 ml H ₂ O pH 8,8 mit HCl
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 19 mM Glycin 0,1% SDS

Tabelle 10: Zusammensetzung von SDS-Trenn –und Sammelgel verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen für zwei Gele.

	Sammelgel	Trenngel			
Acrylamidkonzentration	4%	10%	12%	15%	17%
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-	-	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
30% Acrylamid (Roth)	0,65 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml	5,66 ml
H ₂ O	3,07 ml	4,12 ml	3,45 ml	2,45 ml	1,29 ml
10% Ammonium-Persulfat	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

4.7.14 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die unspezifische Färbung von per SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennten Proteinen wurde das Polyacrylamid-Gel in Coomassie-Färbelösung aufgekocht und weitere 5 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt, das SDS-Gel mit VE-Wasser gewaschen und anschließend in 10% Essigsäure (Roth) aufgekocht. Nach ca. 20 Minuten wurde die Essigsäure entfernt, das SDS-Gel erneut mit VE-Wasser gewaschen und dann per CCD-Kamera (*Image-Quant LAS4000*, GE Healthcare) fotografiert.

Verwendete Puffer:

Coomassie-Färbelösung	25% Isopropanol
	10% Essigsäure
	0,1% Coomassie Brilliant Blue G

4.7.15 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Eine weitere eingesetzte Methode zur unspezifischen Färbung von per SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennten Proteinen war die Silberfärbung. Die Silberfärbung mittels Silbernitrat zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität im Vergleich zur Coomassiefärbung aus und wurde in dieser Arbeit mit dem Kit *Pierce™ Silver Stain for Mass Spectrometry* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.7.16 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen und Affinitätsmarkern

Die Detektion bestimmter Proteine und Affinitätsmarker erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Hierzu mussten die per SDS-PAGE (s. 4.7.13) aufgetrennten SDS-Proteinkomplexe zunächst auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Porengröße 45 µm, Roth) übertragen werden. Hierzu wurde die PVDF-Membran 5 Minuten in Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit Filterpapier (1 mm, Roth) und SDS-Polyacrylamid-Gel mit Transblotpuffer gespült. Der Western Blot wurde nach *semi-dry*-Verfahren aufgebaut, bei welchem das SDS-Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran aufgebracht wird und je zwei Lagen Filterpapier die obere und untere Seite abschließen. Der Protein-Transfer erfolgte mittels der Apparatur *Trans-Blot Turbo* (BioRad) bei einer Stromstärke von 1 A und einer konstanten Spannung von 25 V für 30 Minuten. Die PVDF-Membran wurde anschließend für 1 Stunde in M-TBST geschwenkt, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde der Primärantikörper (s. Tabelle 11) im Verhältnis 1:10000 in M-TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der PVDF-Membran inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreifaches Spülen mit TBST und dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit M-TBST entfernt. Anschließend erfolgte eine 1,5 stündige Inkubation der Membran mit dem, mit Meerrettichperoxidase (HRP)-

konjugierten, Sekundärantikörper (s. Tabelle 11) im Verhältnis 1:10000. Nicht gebundener sekundärer Antikörper wurde durch vierfaches Waschen mit TBST entfernt und die Membran anschließend mit 1 ml des Chemilumineszenz-Reagenzes *Clarity™ Western ECL Substrate* (BioRad) für 5 Minuten inkubiert. Hierbei erfolgt eine HRP-vermittelte Oxidation von Luminol, welche mit einer Emission von Licht einhergeht. Die Detektion erfolgte mittels CCD-Kamera (*Image-Quant LAS4000*, GE Healthcare). Um die Bandenintensität verschiedener Proben zu vergleichen und prozentuale Unterschiede der Intensitäten zu ermitteln, wurde diese mittels *ImageQuantTL* Software (GE Healthcare) quantifiziert und das Ergebnis als *Arbitrary Units* (AIU) berechnet.

Verwendete Puffer:

Transblotpuffer	25 mM Tris, pH 7,5 192 mM Glycerin 20% Ethanol
TBST	20 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 0,05% Tween-20
M-TBST	TBST supplementiert mit 5% Magermilchpulver

Tabelle 11: Verwendete primäre -und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper	Antigen	Verdünnung	Spendertier	Hersteller
Polyklonaler anti-BldD IgG	BldD	1:10000	Kaninchen	In Auftrag, Pineda Antikörper Service
Polyklonaler anti-BldM IgG	BldM	1:10000	Kaninchen	(Al-Bassam et al. 2014)
Polyklonaler anti-BldN IgG	BldN	1:10000	Kaninchen	(Bibb et al. 2012)
Polyklonaler anti-RsbN IgG	RsbN	1:10000	Kaninchen	(Bibb et al. 2012)
Polyklonaler anti-RsiG IgG	RsiG	1:10000	Kaninchen	(Gallagher et al. 2020)

Polyklonaler anti-WhiG IgG	WhiG	1:10000	Kaninchen	(Gallagher et al. 2020)
Monoklonaler anti-FLAG-M2 Antikörper	FLAG-Affinitätsmarker	1:10000	Maus	Sigma-Aldrich
Monoklonaler anti-GFP Antikörper	GFP, Ypet	1:10000	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Sekundäre Antikörper	Antigen	Verdünnung	Spendertier	Hersteller
anti-rabbit-HRP-Antikörper	IgG aus Kaninchen	1:10000	Ziege	GE Healthcare
anti-mouse-HRP-Antikörper	IgG aus Maus	1:10000	Ziege	Thermo Scientific

4.7.17 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die enzymatische Funktion von in *E. coli* generierten und gereinigten Proteinen (s. 4.7.1, 4.7.3, 4.7.4) wurde *in vitro* mittels Diguanylatzyklase (DGC)- und Phosphodiesterase (PDE)-Assays wie in (Christen et al. 2005) und (Weber et al. 2006) beschrieben untersucht. Dabei wurden 1 μ M gereinigtes und in Assay-Puffer dialysiertes Protein mit 4,16 nM [32 P]GTP (Hartmann Analytic GmbH) oder 2,08 nM [32 P]c-di-GMP (Hartmann Analytic GmbH) bei 30°C für 60 Minuten inkubiert. Einzelne Ansätze wurden mit 1 mM unmarkiertem GTP bzw. c-di-GMP supplementiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 5 μ l 0,5 M EDTA pH 8 zum gleichen Volumen an Reaktionslösung gegeben und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. In DGC-Assays wurde PleD*, eine konstitutiv aktive Diguanylatzyklase aus *Caulobacter crescentus* (Paul et al. 2007), als Positivkontrolle mitgeführt. In PDE-Assays wurde PdeH aus *E. coli* (Pesavento et al. 2008) als Positivkontrolle eingesetzt. Die Proben wurden anschließend zur Auftrennung auf Dünnschichtchromatografie-Platten (*Polygram CEL 300 PEI Cellulose TLC Plates*, Macherey–Nagel) aufgetragen und senkrecht über Nacht in Laufpuffer inkubiert. Die Dünnschichtchromatografie-Platten wurden getrocknet und in Klarsichtfolie gehüllt auf einer Röntgenspeicherfolie (*Phosphor Imaging Screen*, Fuji) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Scannen in einem Laserscanner (*Typhoon FLA 7000*, GE Healthcare).

Verwendete Puffer:

Assay-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5
	250 mM NaCl
	10 mM MnCl ₂ oder MgCl ₂
	1 mM β -Mercaptoethanol
	10% Glycerin
Laufpuffer	1:1.5 (v/v) gesättigtes NH ₄ SO ₄ und 1.5M KH ₂ PO ₄ , pH 3.6

4.7.18 *In vitro* UV-Vernetzungsexperimente

In vitro UV-Vernetzungsexperimente von RmdB, RmdB^{GGDEF}, RmdB^{EAL} und [³²P]-GTP (Hartmann Analytic GmbH) sowie [³²P]-c-di-GMP (Hartmann Analytic GmbH) erfolgten wie in (Christen et al. 2005) beschrieben. Dabei wurden die Proteine in einer Konzentration von 4,5 μ M, [³²P]-GTP in einer Konzentration von 83 nM und [³²P]-c-di-GMP in einer Konzentration von 42 nM eingesetzt. Die Kompetition erfolgte durch die Supplementation von 250 μ M c-di-GMP (Sigma) bzw. 500 μ M GTP (Sigma).

4.7.19 Protein-DNA Interaktionsanalysen (EMSA)

Die Interaktion von Proteinen und DNA wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) untersucht. Dabei wird DNA mit Protein inkubiert und per Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 4.7.13) aufgetrennt. Kommt es zu einer Interaktion, läuft die DNA versetzt zu ihrem eigentlichen Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurde die Promotorregion (pDNA) von *rmdA* und *rmdB* per PCR (s. 4.5.4) und spezifischer Oligonukleotide (s. Tabelle 7) amplifiziert und mit His-BldD inkubiert. Zudem wurden Ansätze mit ansteigenden c-di-GMP Konzentrationen und poly[d(I-C)] (Roch) zur DNA-Kompetition supplementiert. Die Zusammensetzung eines EMSA-Ansatzes ist im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt. Die Ansätze wurden für 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend auf 5 % Polyacrylamid-Gele geladen und 1 Stunde bei 90 V in 0,5x TBE aufgetrennt. Die DNA wurde wie in 4.5.8 beschrieben gefärbt und die Banden sichtbar gemacht.

Verwendete Puffer:

10x EMSA-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,5
	100 mM NaCl
	50 mM DTT

	10 mM EDTA
	10 mM MgCl ₂
	50% Glycerin
0,5x TBE Puffer	45 mM Tris-Borat
	0,1 mM EDTA

4.7.20 Aminosäuresequenzvergleich und *in silico* Analyse der Domänenstruktur

Aminosäuresequenzen wurden *in silico* mit Hilfe der Software *Serial Cloner* (Serialbasics) erstellt und organisiert. Aminosäuresequenzvergleiche wurden mit dem Online-Tool *BLASTp* (NCBI) (Morgulis et al. 2008) durchgeführt. Aminosäuresequenzen von *S. venezuelae* wurden mit Hilfe der Online-Datenbank *StrepDB* (<http://strepdb.Streptomyces.org.uk/>) gesucht. Die Domänenstruktur von Proteinen wurde mit Hilfe des Online-Tools SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic and Bork 2018) untersucht.

4.7.21 Protein-Protein Interaktionsanalysen

4.7.21.1 Bacterial Two Hybrid Assay

Um die Interaktion von Proteinen oder einzelnen Proteindomänen *in vivo* zu untersuchen, wurden *Bacterial-Two-Hybrid* (BTH)-Assays durchgeführt. Die BTH-Methode nach (Karimova et al. 1998) basiert auf der Wiederherstellung der Adenylatzyklase (CyaA)-Aktivität und ermöglicht somit die cAMP-abhängige Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen wie Maltose. Die kodierenden Genabschnitte der CyaA-Untereinheiten T18 bzw. T25 aus *Bordetella pertussis* liegen auf vier unterschiedlichen Plasmiden vor (s. Tabelle 3) (*Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit*, EUROMEDEX). In diese Plasmide wurde die jeweilige proteinkodierende Gensequenz von *rmdA* und *rmdB* kloniert, so dass nach Expression der Plasmide eine Fusion mit den T18 bzw. T25 Untereinheiten geschaffen wurde. Je nach Plasmid ist das Zielprotein nach Expression C-terminal (pKT25, pUT18C) oder N-terminal (pKNT25, pUT18) mit der T18- bzw. TN25-Einheit fusioniert. Interagieren die zu testenden Proteine, kommt es zu einer interaktionsvermittelten räumlichen Nähe der T18- und T25-Einheiten, wodurch cAMP gebildet wird. Die BTH-Plasmide wurden in *E. coli* AR388 Zellen (s. Tabelle 2) co-transformiert (s. 4.5.11 und 4.5.12), in welchen das Adenylatzyklase kodierende Gen (*cyaA*) deletiert ist. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten (s. 4.3.2), supplementiert mit X-Gal sowie Ampicillin und Kanamycin (s. 4.3.3), zur Selektion ausplattiert. Ein erstes Anzeichen für eine Interaktion der getesteten Proteine stellte eine Blaufärbung der anwachsenden Kolonien dar. Die Blaufärbung wird durch die Hydrolyse von

X-Gal in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hervorgerufen, welche durch β -Galaktosidase katalysiert wird. Die Expression der β -Galaktosidase ist dabei cAMP-abhängig. Drei Kolonien je Ansatz wurden in 1 ml 1x PBS resuspendiert und 3 μ l der Zellsuspension auf MacConkey-Agarplatten (s. 4.3.2), supplementiert mit Maltose sowie Ampicillin und Kanamycin, getropft und bei 26°C inkubiert. Eine Interaktion der getesteten Fusionsproteine wurde durch Rotfärbung der Kolonien nach 1-3 Tagen angezeigt. Diese beruhte wiederum auf der interaktionsvermittelten Generierung von cAMP, welches zusammen mit dem *Catabolite Activator Protein* (CAP) einen Komplex bildet und die Expression von Genen für den fermentativen Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen (z.B. Maltose) induziert. Die Fermentationsprodukte führen wiederum zu einer Ansäuerung der Umgebung, welche durch einen Farbumschlag des im Medium vorhandenen pH-Indikators Neutralrot sichtbar wird. Als Positivkontrolle diente die Co-Transformation von pKT25-zip und pUT18C-zip, wobei die exprimierten ZIP-Domänen eine sehr starke Dimerisierung aufweisen. Als Negativkontrolle diente die Co-Transformation von pUT18 und pKT25 Leervektoren.

4.7.21.2 *In vivo* Co-Immunopräzipitation von Proteininteraktionspartnern

Ein weiterer Ansatz für die Identifizierung von Interaktionspartnern war die Co-Immunopräzipitation. Hierbei sollen Protein-Protein-Interaktionen in den Komplementationsstämmen *S. venezuelae* $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG bzw. *S. venezuelae* $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG (s. Tabelle 2) spezifisch über den FLAG-Affinitätsmarker co-isoliert und eluiert werden. Die Identifikation der Interaktionspartner erfolgte nach Western Blot (s. 4.7.16) durch Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern. Für die Co-Immunopräzipitation von möglichen Interaktionspartnern wurden $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG, $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG sowie *S. venezuelae* WT für 20 Stunden in 500 ml MYM-Medium kultiviert (s. 4.3.1 und 4.4.4) und anschließend 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zwei Mal mit 50 ml 1x PBS, supplementiert mit Proteaseinhibitor (*cOmplete Mini EDTA-frei*, Roche), gewaschen und anschließend in 30 ml TBS resuspendiert. Die Zellyse erfolgte mittels Hochdruckaufschlussverfahren (*HTU Digi French Press*, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik GmbH) bei ca. 18.000 psi. Das Aufschlussverfahren wurde vier Mal wiederholt und das Zelllysate für 10 Minuten bei 5000 rpm im Schwenkrotor zentrifugiert. Vom Überstand des Zelllysates wurden 0,5 ml abgenommen und später als Kontrolle eingesetzt. Von allen Proben wurde die Proteinkonzentration per Bradford bestimmt (s. 4.7.7). Pro 135 mg Gesamtprotein wurden 400 μ l *ANTI-FLAG M2 affinity Gel* (Sigma) eingesetzt. Dieses wurde drei Mal mit 0,1 M Glycin pH 3,5 und anschließend einmal mit TBS gewaschen. Für die Bindung von Protein mit FLAG-Affinitätsmarker an die Matrix wurde das Zelllysate drei Mal über die Säule gegeben und diese anschließend fünf Mal mit 20 ml TBS gewaschen. Zum Eluieren von gebundenem Protein wurde die Gelmatrix für 30 Minuten mit 500 μ l 3x *FLAG-Tag-Peptid*

(100 µg/ml, Sigma) inkubiert und das Eluat anschließend in *Low-protein-binding* Reaktionsgefäßen (Sarstedt) aufgefangen. Für die Auftrennung mittels SDS-PAGE (s. 4.7.13) wurden 10 µg der Zelllysatsproben in 1x SDS-Ladepuffer verdünnt und die Eluate unverdünnt mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt, so dass das Endvolumen 20 µl ergab. Alle Proben wurden für 20 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die Proteinbanden wurden per Western Blot aus PVDF-Membran übertragen und die Identifikation potenzieller Interaktionspartner erfolgte durch Immunodetektion (s. 4.7.16) mittels spezifischer Antikörper (s. Tabelle 11). Als Kontrolle und zur Abschätzung der gereinigten RmdA-FLAG und RmdB-FLAG Mengen wurde eine Silberfärbung (s. 4.7.15) nach SDS-PAGE durchgeführt, wobei die auftretenden Bandenmuster in den Eluatproben von *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA::rmdA-FLAG$ und $\Delta rmdB::rmdB-FLAG$ miteinander verglichen wurden.

Verwendete Puffer:

TBS	50 mM Tris, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,8% Triton-X 100

4.8 Methoden zur phänotypischen Analyse von *S. venezuelae*

4.8.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Um die morphologische Differenzierung von *S. venezuelae* in Flüssigkultur zu bestimmen, wurde diese mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Dazu wurden 10 µl der Flüssigkultur auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mittels 100x Vergrößerung im Mikroskop (*Axio Observer Z.1* Mikroskop gekoppelt mit einer *Axiocam 506 mono* Kamera, Zeiss) analysiert und fotografiert. Zellkultur, welche für Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden sollte, wurde zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 µl auf ein ca. 2 mm dickes Agarosegelstück (1%) getropft, welches bereits auf einem Objektträger vorbereitet war. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels *Axio Observer Z.1* Mikroskop (Zeiss), welches mit einer *Axiocam 506 mono* Kamera (Zeiss) gekoppelt war. Bei 100x Vergrößerung wurde Immersionsöl (Zeiss) eingesetzt. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels ADOBE Photoshop Software.

4.8.2 Herstellung von Makrokolonien und Hydrophobizitätstest

Die Kultivierung von *S. venezuelae* Stämmen als Makrokolonien auf Festmedium ermöglichte es, morphologische und entwicklungsspezifische Unterschiede zwischen verschiedenen

Stämmen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Dabei können Details wie die dreidimensionale Struktur, Koloniegröße und Färbung analysiert werden. Zudem verläuft die entwicklungsspezifische Differenzierung auf Festmedium wesentlich langsamer ab als in Flüssigkultur. Für die Herstellung von *S. venezuelae* Makrokolonien wurde eine Sporenlösung mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ CFU/ μ l hergestellt und hiervon 12 μ l auf eine MYM-Agarplatte (s. 4.3.2) getropft. Makrokolonien wurden über einen Zeitraum von fünf bis sieben Tagen bei 30°C kultiviert und täglich mittels eines Binokulars analysiert und ggf. fotografiert (*Stemi 2000C* gekoppelt mit einer *AxioCAM ICc 3* Kamera, Zeiss). Um die Hydrophobizität der Makrokolonien zu untersuchen, wurden 10 μ l ddH₂O, supplementiert mit Coomassie-Brilliant-Blue (Roth), auf die Kolonien getropft.

Referenzen

- Al-Bassam, M. M., M. J. Bibb, M. J. Bush, G. Chandra, and M. J. Buttner. 2014. 'Response regulator heterodimer formation controls a key stage in *Streptomyces* development', *PLoS Genet*, 10: e1004554.
- Al-Bassam, M. M., J. Haist, S. A. Neumann, S. Lindenberg, and N. Tschowri. 2018. 'Expression Patterns, Genomic Conservation and Input Into Developmental Regulation of the GGDEF/EAL/HD-GYP Domain Proteins in *Streptomyces*', *Front Microbiol*, 9: 2524.
- Amikam, D., and M. Y. Galperin. 2006. 'PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein', *Bioinformatics*, 22: 3-6.
- Ausmees, N., H. Wahlstedt, S. Bagchi, M. A. Elliot, M. J. Buttner, and K. Flardh. 2007. 'SmeA, a small membrane protein with multiple functions in *Streptomyces* sporulation including targeting of a SpoIIIE/FtsK-like protein to cell division septa', *Mol Microbiol*, 65: 1458-73.
- Bacterio.net/streptomyces. 2020. 'Genus *Streptomyces*. Available online at: <http://www.bacterio.net/streptomyces.html>'.
- Balzer, D., W. Pansegrau, and E. Lanka. 1994. 'Essential motifs of relaxase (Tral) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4', *J Bacteriol*, 176: 4285-95.
- Bellini, D., D. L. Caly, Y. McCarthy, M. Bumann, S. Q. An, J. M. Dow, R. P. Ryan, and M. A. Walsh. 2014. 'Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre', *Mol Microbiol*, 91: 26-38.
- Bharati, B. K., I. M. Sharma, S. Kasetty, M. Kumar, R. Mukherjee, and D. Chatterji. 2012. 'A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*', *Microbiology*, 158: 1415-27.
- Bibb, M. J., A. Domonkos, G. Chandra, and M. J. Buttner. 2012. 'Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by sigma(BldN) and a cognate anti-sigma factor, RsbN', *Mol Microbiol*, 84: 1033-49.
- Bibb, M. J., V. Molle, and M. J. Buttner. 2000. 'sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *J Bacteriol*, 182: 4606-16.
- Bobek, J., K. Smidova, and M. Cihak. 2017. 'A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*', *Front Microbiol*, 8: 2205.
- Bradford, M. M. 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Bush, M. J., Al-Bassam, M. M., Chandra, G., Findlay, K. C. & Buttner, M. J. 2018. 'BldC delays entry into development to produce a sustained period of vegetative growth in *Streptomyces venezuelae*', *bioRxiv*.
- Bush, M. J., M. J. Bibb, G. Chandra, K. C. Findlay, and M. J. Buttner. 2013. 'Genes required for aerial growth, cell division, and chromosome segregation are targets of WhiA before sporulation in *Streptomyces venezuelae*', *MBio*, 4: e00684-13.
- Bush, M. J., G. Chandra, M. J. Bibb, K. C. Findlay, and M. J. Buttner. 2016. 'Genome-Wide Chromatin Immunoprecipitation Sequencing Analysis Shows that WhiB Is a Transcription Factor That Cocontrols Its Regulon with WhiA To Initiate Developmental Cell Division in *Streptomyces*', *MBio*, 7: e00523-16.
- Bush, M. J., G. Chandra, K. C. Findlay, and M. J. Buttner. 2017. 'Multi-layered inhibition of *Streptomyces* development: BldO is a dedicated repressor of whiB', *Mol Microbiol*, 104: 700-11.
- Bush, M. J., N. Tschowri, S. Schlimpert, K. Flardh, and M. J. Buttner. 2015. 'c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes', *Nat Rev Microbiol*, 13: 749-60.

- Capstick, D. S., J. M. Willey, M. J. Buttner, and M. A. Elliot. 2007. 'SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*', *Mol Microbiol*, 64: 602-13.
- Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. C. Amiot, B. Giese, U. Jenal, and T. Schirmer. 2004. 'Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 17084-9.
- Chater, K. F. 2016. 'Recent advances in understanding *Streptomyces*', *F1000Res*, 5: 2795.
- Chou, S. H., and M. Y. Galperin. 2016. 'Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms', *J Bacteriol*, 198: 32-46.
- Christen, B., M. Christen, R. Paul, F. Schmid, M. Folcher, P. Jenoe, M. Meuwly, and U. Jenal. 2006. 'Allosteric control of cyclic di-GMP signaling', *J Biol Chem*, 281: 32015-24.
- Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte, and U. Jenal. 2005. 'Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP', *J Biol Chem*, 280: 30829-37.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller. 1989. 'One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 2172-5.
- Claessen, D., R. Rink, W. de Jong, J. Siebring, P. de Vreugd, F. G. Boersma, L. Dijkhuizen, and H. A. Wosten. 2003. 'A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils', *Genes Dev*, 17: 1714-26.
- Claessen, D., H. A. Wosten, G. van Keulen, O. G. Faber, A. M. Alves, W. G. Meijer, and L. Dijkhuizen. 2002. 'Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface', *Mol Microbiol*, 44: 1483-92.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6640-5.
- De, N., M. V. Navarro, R. V. Raghavan, and H. Sondermann. 2009. 'Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR', *J Mol Biol*, 393: 619-33.
- den Hengst, C. D., N. T. Tran, M. J. Bibb, G. Chandra, B. K. Leskiw, and M. J. Buttner. 2010. 'Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth', *Mol Microbiol*, 78: 361-79.
- Ditkowski, B., N. Holmes, J. Rydzak, M. Donczew, M. Bezulska, K. Ginda, P. Kedzierski, J. Zakrzewska-Czerwinska, G. H. Kelemen, and D. Jakimowicz. 2013. 'Dynamic interplay of ParA with the polarity protein, Scy, coordinates the growth with chromosome segregation in *Streptomyces coelicolor*', *Open Biol*, 3: 130006.
- Duerig, A., S. Abel, M. Folcher, M. Nicollier, T. Schwede, N. Amiot, B. Giese, and U. Jenal. 2009. 'Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression', *Genes Dev*, 23: 93-104.
- Elliot, M. A., N. Karoonuthaisiri, J. Huang, M. J. Bibb, S. N. Cohen, C. M. Kao, and M. J. Buttner. 2003. 'The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*', *Genes Dev*, 17: 1727-40.
- Elliot, M. A., and B. K. Leskiw. 1999. 'The BldD protein from *Streptomyces coelicolor* is a DNA-binding protein', *J Bacteriol*, 181: 6832-5.
- Fazli, M., A. O'Connell, M. Nilsson, K. Niehaus, J. M. Dow, M. Givskov, R. P. Ryan, and T. Tolker-Nielsen. 2011. 'The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*', *Mol Microbiol*, 82: 327-41.
- Feeney, M. A., G. Chandra, K. C. Findlay, M. S. B. Paget, and M. J. Buttner. 2017. 'Translational Control of the SigR-Directed Oxidative Stress Response in *Streptomyces* via IF3-Mediated Repression of a Noncanonical GTC Start Codon', *MBio*, 8.
- Fernandez-Moreno, M. A., E. Martinez, L. Boto, D. A. Hopwood, and F. Malpartida. 1992. 'Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of

- Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin', *J Biol Chem*, 267: 19278-90.
- Ferreira, R. B., L. C. Antunes, E. P. Greenberg, and L. L. McCarter. 2008. 'Vibrio parahaemolyticus ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces', *J Bacteriol*, 190: 851-60.
- Flardh, K., and M. J. Buttner. 2009. 'Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium', *Nat Rev Microbiol*, 7: 36-49.
- Flardh, K., E. Leibovitz, M. J. Buttner, and K. F. Chater. 2000. 'Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter', *Mol Microbiol*, 38: 737-49.
- Flardh, K., D. M. Richards, A. M. Hempel, M. Howard, and M. J. Buttner. 2012. 'Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*', *Curr Opin Microbiol*, 15: 737-43.
- Frojd, M. J., and K. Flardh. 2019. 'Extrusion of extracellular membrane vesicles from hyphal tips of *Streptomyces venezuelae* coupled to cell-wall stress', *Microbiology*, 165: 1295-305.
- Fuchino, K., S. Bagchi, S. Cantlay, L. Sandblad, D. Wu, J. Bergman, M. Kamali-Moghaddam, K. Flardh, and N. Ausmees. 2013. 'Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E1889-97.
- Gallagher, K. A., M. A. Schumacher, M. J. Bush, M. J. Bibb, G. Chandra, N. A. Holmes, W. Zeng, M. Henderson, H. Zhang, K. C. Findlay, R. G. Brennan, and M. J. Buttner. 2020. 'c-di-GMP Arms an Anti-sigma to Control Progression of Multicellular Differentiation in *Streptomyces*', *Mol Cell*, 77: 586-99 e6.
- Galperin, M. Y. 2004. 'Bacterial signal transduction network in a genomic perspective', *Environ Microbiol*, 6: 552-67.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, 3rd, and H. O. Smith. 2009. 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases', *Nat Methods*, 6: 343-5.
- Gundlach, J., F. M. Mehne, C. Herzberg, J. Kampf, O. Valerius, V. Kaefer, and J. Stulke. 2015. 'An Essential Poison: Synthesis and Degradation of Cyclic Di-AMP in *Bacillus subtilis*', *J Bacteriol*, 197: 3265-74.
- Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, and K. F. Chater. 2003. 'PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 1541-6.
- Haeusser, D. P., and W. Margolin. 2016. 'Splitville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring', *Nat Rev Microbiol*, 14: 305-19.
- Haiser, H. J., M. R. Yousef, and M. A. Elliot. 2009. 'Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*', *J Bacteriol*, 191: 6501-12.
- Haist, J., S. A. Neumann, M. M. Al-Bassam, S. Lindenberg, M. A. Elliot, and N. Tschowri. 2020. 'Specialized and shared functions of diguanylate cyclases and phosphodiesterases in *Streptomyces* development', *Mol Microbiol*.
- Hayashi, K., N. Morooka, Y. Yamamoto, K. Fujita, K. Isono, S. Choi, E. Ohtsubo, T. Baba, B. L. Wanner, H. Mori, and T. Horiuchi. 2006. 'Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110', *Mol Syst Biol*, 2: 2006 0007.
- Hempel, A. M., S. Cantlay, V. Molle, S. B. Wang, M. J. Naldrett, J. L. Parker, D. M. Richards, Y. G. Jung, M. J. Buttner, and K. Flardh. 2012. 'The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2371-9.
- Hengge, R. 2009. 'Principles of c-di-GMP signalling in bacteria', *Nat Rev Microbiol*, 7: 263-73.
- Henry, J. T., and S. Crosson. 2011. 'Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context', *Annu Rev Microbiol*, 65: 261-86.
- Herbst, S., M. Lorkowski, O. Sarenko, T. K. L. Nguyen, T. Jaenicke, and R. Hengge. 2018. 'Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase', *EMBO J*, 37.

- Higo, A., S. Horinouchi, and Y. Ohnishi. 2011. 'Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus*', *Mol Microbiol*, 81: 1607-22.
- Holland, L. M., S. T. O'Donnell, D. A. Ryjenkov, L. Gomelsky, S. R. Slater, P. D. Fey, M. Gomelsky, and J. P. O'Gara. 2008. 'A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP', *J Bacteriol*, 190: 5178-89.
- Holmes, N. A., J. Walshaw, R. M. Leggett, A. Thibessard, K. A. Dalton, M. D. Gillespie, A. M. Hemmings, B. Gust, and G. H. Kelemen. 2013. 'Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E397-406.
- Hong, H. J., M. I. Hutchings, L. M. Hill, and M. J. Buttner. 2005. 'The role of the novel Fem protein Vank in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*', *J Biol Chem*, 280: 13055-61.
- Hopwood, David A. 2007. *Streptomyces in Nature and Medicine*.
- Hull, T. D., M. H. Ryu, M. J. Sullivan, R. C. Johnson, N. T. Klena, R. M. Geiger, M. Gomelsky, and J. A. Bennett. 2012. 'Cyclic Di-GMP phosphodiesterases RmdA and RmdB are involved in regulating colony morphology and development in *Streptomyces coelicolor*', *J Bacteriol*, 194: 4642-51.
- Jakimowicz, D., and G. P. van Wezel. 2012. 'Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere?', *Mol Microbiol*, 85: 393-404.
- Jenal, U., A. Reinders, and C. Lori. 2017. 'Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire', *Nat Rev Microbiol*, 15: 271-84.
- Jones, S. E., and M. A. Elliot. 2018. 'Exploring' the regulation of *Streptomyces* growth and development', *Curr Opin Microbiol*, 42: 25-30.
- Jones, S. E., L. Ho, C. A. Rees, J. E. Hill, J. R. Nodwell, and M. A. Elliot. 2017. 'Streptomyces exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals', *Elife*, 6.
- Jones, S. E., C. A. Pham, M. P. Zambri, J. McKillip, E. E. Carlson, and M. A. Elliot. 2019. 'Streptomyces Volatile Compounds Influence Exploration and Microbial Community Dynamics by Altering Iron Availability', *MBio*, 10.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant. 1998. 'A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 5752-6.
- Kelemen, G. H., P. Brian, K. Flardh, L. Chamberlin, K. F. Chater, and M. J. Buttner. 1998. 'Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)', *J Bacteriol*, 180: 2515-21.
- Kim, I. K., C. J. Lee, M. K. Kim, J. M. Kim, J. H. Kim, H. S. Yim, S. S. Cha, and S. O. Kang. 2006. 'Crystal structure of the DNA-binding domain of BldD, a central regulator of aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Mol Microbiol*, 60: 1179-93.
- Kim, J. M., H. S. Won, and S. O. Kang. 2014. 'The C-terminal domain of the transcriptional regulator BldD from *Streptomyces coelicolor* A3(2) constitutes a novel fold of winged-helix domains', *Proteins*, 82: 1093-8.
- Kodani, S., M. E. Hudson, M. C. Durrant, M. J. Buttner, J. R. Nodwell, and J. M. Willey. 2004. 'The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 11448-53.
- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-5.
- Latoscha, A., M. E. Wormann, and N. Tschowri. 2019. 'Nucleotide second messengers in *Streptomyces*', *Microbiology*, 165: 1153-65.
- Lee, E. R., J. L. Baker, Z. Weinberg, N. Sudarsan, and R. R. Breaker. 2010. 'An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger', *Science*, 329: 845-48.
- Letunic, I., and P. Bork. 2018. '20 years of the SMART protein domain annotation resource', *Nucleic Acids Res*, 46: D493-D96.

- Li, W., M. Li, L. Hu, J. Zhu, Z. Xie, J. Chen, and Z. G. He. 2018. 'HpoR, a novel c-di-GMP effective transcription factor, links the second messenger's regulatory function to the mycobacterial antioxidant defense', *Nucleic Acids Res*, 46: 3595-611.
- Lindenberg, S., G. Klauck, C. Pesavento, E. Klauck, and R. Hengge. 2013. 'The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in E. coli biofilm control', *EMBO J*, 32: 2001-14.
- Linder, J. U. 2006. 'Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation', *Cell Mol Life Sci*, 63: 1736-51.
- Liu, G., K. F. Chater, G. Chandra, G. Niu, and H. Tan. 2013. 'Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces', *Microbiol Mol Biol Rev*, 77: 112-43.
- Liu, X., G. Zheng, G. Wang, W. Jiang, L. Li, and Y. Lu. 2019. 'Overexpression of the diguanylate cyclase CdgD blocks developmental transitions and antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*', *Sci China Life Sci*, 62: 1492-505.
- Makitrynsky, R., O. Tsyplik, D. Nuzzo, T. Paululat, D. L. Zechel, and A. Bechthold. 2020. 'Secondary nucleotide messenger c-di-GMP exerts a global control on natural product biosynthesis in streptomycetes', *Nucleic Acids Res*, 48: 1583-98.
- McCormick, J. R., and K. Flardh. 2012. 'Signals and regulators that govern *Streptomyces* development', *FEMS Microbiol Rev*, 36: 206-31.
- McCormick, J. R., E. P. Su, A. Driks, and R. Losick. 1994. 'Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*', *Mol Microbiol*, 14: 243-54.
- Moglich, A., R. A. Ayers, and K. Moffat. 2009. 'Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains', *Structure*, 17: 1282-94.
- Morgan, J. L., J. T. McNamara, and J. Zimmer. 2014. 'Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP', *Nat Struct Mol Biol*, 21: 489-96.
- Morgulis, A., G. Coulouris, Y. Raytselis, T. L. Madden, R. Agarwala, and A. A. Schaffer. 2008. 'Database indexing for production MegaBLAST searches', *Bioinformatics*, 24: 1757-64.
- Navarro, M. V., N. De, N. Bae, Q. Wang, and H. Sondermann. 2009. 'Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX', *Structure*, 17: 1104-16.
- Newell, P. D., C. D. Boyd, H. Sondermann, and G. A. O'Toole. 2011. 'A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage', *PLoS Biol*, 9: e1000587.
- Paget, M. S., L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, and M. J. Buttner. 1999. 'Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *J Bacteriol*, 181: 204-11.
- Paul, R., S. Abel, P. Wassmann, A. Beck, H. Heerklotz, and U. Jenal. 2007. 'Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization', *J Biol Chem*, 282: 29170-7.
- Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal. 2004. 'Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain', *Genes Dev*, 18: 715-27.
- Pei, J., and N. V. Grishin. 2001. 'GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase', *Proteins*, 42: 210-6.
- Persson, J., K. F. Chater, and K. Flardh. 2013. 'Molecular and cytological analysis of the expression of *Streptomyces* sporulation regulatory gene *whiH*', *FEMS Microbiol Lett*, 341: 96-105.
- Pesavento, C., G. Becker, N. Sommerfeldt, A. Possling, N. Tschowri, A. Mehlis, and R. Hengge. 2008. 'Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*', *Genes Dev*, 22: 2434-46.
- Petters, T., X. Zhang, J. Nesper, A. Treuner-Lange, N. Gomez-Santos, M. Hoppert, U. Jenal, and L. Sogaard-Andersen. 2012. 'The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in *Myxococcus xanthus*', *Mol Microbiol*, 84: 147-65.
- Ponting, C. P., and L. Aravind. 1997. 'PAS: a multifunctional domain family comes to light', *Curr Biol*, 7: R674-7.

- Procopio, R. E., I. R. Silva, M. K. Martins, J. L. Azevedo, and J. M. Araujo. 2012. 'Antibiotics produced by *Streptomyces*', *Braz J Infect Dis*, 16: 466-71.
- Qi, Y., F. Rao, Z. Luo, and Z. X. Liang. 2009. 'A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in AxDGC2 from *Acetobacter xylinum*', *Biochemistry*, 48: 10275-85.
- Richter, A. M., A. Possling, N. Malysheva, K. P. Yousef, S. Herbst, M. von Kleist, and R. Hengge. 2020. 'Local c-di-GMP signaling in the control of synthesis of the *E. coli* biofilm exopolysaccharide pEtN-cellulose', *J Mol Biol*.
- Rigali, S., S. Anderssen, A. Naome, and G. P. van Wezel. 2018. 'Cracking the regulatory code of biosynthetic gene clusters as a strategy for natural product discovery', *Biochem Pharmacol*, 153: 24-34.
- Romling, U., M. Y. Galperin, and M. Gomelsky. 2013. 'Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger', *Microbiol Mol Biol Rev*, 77: 1-52.
- Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and M. Benziman. 1987. 'Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid', *Nature*, 325: 279-81.
- Ryjenkov, D. A., R. Simm, U. Romling, and M. Gomelsky. 2006. 'The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria', *J Biol Chem*, 281: 30310-4.
- Salerno, P., J. Larsson, G. Bucca, E. Laing, C. P. Smith, and K. Flardh. 2009. 'One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally regulated and specifically involved in spore maturation', *J Bacteriol*, 191: 6489-500.
- Sanger, F., and A. R. Coulson. 1975. 'A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase', *J Mol Biol*, 94: 441-8.
- Sarenko, O., G. Klauck, F. M. Wilke, V. Pfiffer, A. M. Richter, S. Herbst, V. Kaefer, and R. Hengge. 2017. 'More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*', *MBio*, 8.
- Schirmer, T. 2016. 'C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation', *J Mol Biol*, 428: 3683-701.
- Schlimpert, S., S. Wasserstrom, G. Chandra, M. J. Bibb, K. C. Findlay, K. Flardh, and M. J. Buttner. 2017. 'Two dynamin-like proteins stabilize FtsZ rings during *Streptomyces* sporulation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E6176-E83.
- Schmidt, A. J., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky. 2005. 'The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains', *J Bacteriol*, 187: 4774-81.
- Schumacher, M. A., M. J. Bush, M. J. Bibb, F. Ramos-Leon, G. Chandra, W. Zeng, and M. J. Buttner. 2018. 'The crystal structure of the RsbN-sigmaBldN complex from *Streptomyces venezuelae* defines a new structural class of anti-sigma factor', *Nucleic Acids Res*, 46: 7467-68.
- Schumacher, M. A., C. D. den Hengst, M. J. Bush, T. B. K. Le, N. T. Tran, G. Chandra, W. Zeng, B. Travis, R. G. Brennan, and M. J. Buttner. 2018. 'The MerR-like protein BldC binds DNA direct repeats as cooperative multimers to regulate *Streptomyces* development', *Nat Commun*, 9: 1139.
- Schumacher, M. A., W. Zeng, K. C. Findlay, M. J. Buttner, R. G. Brennan, and N. Tschowri. 2017. 'The *Streptomyces* master regulator BldD binds c-di-GMP sequentially to create a functional BldD2-(c-di-GMP)₄ complex', *Nucleic Acids Res*, 45: 6923-33.
- Seshasayee, A. S., G. M. Fraser, and N. M. Luscombe. 2010. 'Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity', *Nucleic Acids Res*, 38: 5970-81.
- Som, N. F., D. Heine, N. A. Holmes, J. T. Munnoch, G. Chandra, R. F. Seipke, P. A. Hoskisson, B. Wilkinson, and M. I. Hutchings. 2017. 'The Conserved Actinobacterial Two-

- Component System MtrAB Coordinates Chloramphenicol Production with Sporulation in *Streptomyces venezuelae* NRRL B-65442', *Front Microbiol*, 8: 1145.
- Srivastava, D., M. L. Hsieh, A. Khataokar, M. B. Neiditch, and C. M. Waters. 2013. 'Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production', *Mol Microbiol*, 90: 1262-76.
- Sun, J., A. Hesketh, and M. Bibb. 2001. 'Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *J Bacteriol*, 183: 3488-98.
- Takano, E. 2006. 'Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation', *Curr Opin Microbiol*, 9: 287-94.
- Tamayo, R., J. T. Pratt, and A. Camilli. 2007. 'Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis', *Annu Rev Microbiol*, 61: 131-48.
- Tarutina, M., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky. 2006. 'An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP', *J Biol Chem*, 281: 34751-8.
- Taylor, B. L., and I. B. Zhulin. 1999. 'PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light', *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 479-506.
- Taylor, R. G., D. C. Walker, and R. R. McInnes. 1993. 'E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing', *Nucleic Acids Res*, 21: 1677-8.
- Tchigvintsev, A., X. Xu, A. Singer, C. Chang, G. Brown, M. Proudfoot, H. Cui, R. Flick, W. F. Anderson, A. Joachimiak, M. Y. Galperin, A. Savchenko, and A. F. Yakunin. 2010. 'Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases', *J Mol Biol*, 402: 524-38.
- Thomason, L. C., J. A. Sawitzke, X. Li, N. Costantino, and D. L. Court. 2014. 'Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination', *Curr Protoc Mol Biol*, 106: 1 16 1-39.
- Traag, B. A., G. H. Kelemen, and G. P. Van Wezel. 2004. 'Transcription of the sporulation gene *ssgA* is activated by the IclR-type regulator SsgR in a *whi*-independent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Mol Microbiol*, 53: 985-1000.
- Tran, N. T., C. D. Den Hengst, J. P. Gomez-Escribano, and M. J. Buttner. 2011. 'Identification and characterization of CdgB, a diguanylate cyclase involved in developmental processes in *Streptomyces coelicolor*', *J Bacteriol*, 193: 3100-8.
- Tschowri, N. 2016. 'Cyclic Dinucleotide-Controlled Regulatory Pathways in *Streptomyces* Species', *J Bacteriol*, 198: 47-54.
- Tschowri, N., M. A. Schumacher, S. Schlimpert, N. B. Chinnam, K. C. Findlay, R. G. Brennan, and M. J. Buttner. 2014. 'Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development', *Cell*, 158: 1136-47.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. F. Fitzgerald, K. F. Chater, and D. van Sinderen. 2007. 'Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum', *Microbiol Mol Biol Rev*, 71: 495-548.
- Waksman, S. A., and A. T. Henrici. 1943. 'The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes', *J Bacteriol*, 46: 337-41.
- Wassmann, P., C. Chan, R. Paul, A. Beck, H. Heerklotz, U. Jenal, and T. Schirmer. 2007. 'Structure of BeF₃⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition', *Structure*, 15: 915-27.
- Weber, H., C. Pesavento, A. Possling, G. Tischendorf, and R. Hengge. 2006. 'Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 62: 1014-34.
- Willemse, J., J. W. Borst, E. de Waal, T. Bisseling, and G. P. van Wezel. 2011. 'Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*', *Genes Dev*, 25: 89-99.
- Wiley, J., R. Santamaria, J. Guijarro, M. Geistlich, and R. Losick. 1991. 'Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*', *Cell*, 65: 641-50.

Yan, H., X. Lu, D. Sun, S. Zhuang, Q. Chen, Z. Chen, J. Li, and Y. Wen. 2020. 'BldD, a master developmental repressor, activates antibiotic production in two *Streptomyces* species', *Mol Microbiol*, 113: 123-42.

Anhang

Tabelle 12: Pipettierschema für EMSA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH ₂ O	Größe n- marker	16,2 µl	10,2 µl	9,52 µl	9,2 µl	8,52µl	8,2 µl	7,2 µl	6,2 µl	5,2 µl
10x EMSA- Puffer		2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
poly[d(I- C)]		0,5 µl	0,5µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
pDNA (40 ng/µl)		0,48 µl	0,48µl	0,48 µl	0,48 µl	0,48 µl	0,48 µl	0,48 µl	0,48 µl	0,48 µl
c-di- GMP (10 µM)				0,5 µl 0,25 µM	1 µl 0,5 µM	1,5 µl 0,75 µM	2 µl 1 µM	3 µl 1,5 µM	4 µl 2 µM	5 µl 2,5 µM
His- BldD (30,8 ng/µl) (600 nM)			7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl

vnz_33670	MERPAWAPPGIDISVPSVSRMYDFYLGGSNFEVDREAARKAMEFIPGLPKIMQANRAFM	60
B7C62_33695	merpawapqgidisvpsvsrmydfylggshnfevdreaarkameflpglpkimqanrafm	60
	*****:*****	
vnz_33670	RRAVRHAVDNDVTQFLDIGSGIPTFGNVHEVARAADPAARVVYVDHDPVAVAHSAVLGDG	120
B7C62_33695	rravryaveqgidqfldigsgiptfgnvhevaqaadplakvayvdhdpvavahsqavleg	120
	*****:*.:.: *****:*****:*****:*.:.*****:***:*	
vnz_33670	DEGAADVAAADLRKPSDILHSPEVTRLDDLRFVALLLVAVLHFLEDEDRPYEAVAELEIDA	180
B7C62_33695	ddraviaaaadlrrpkeilahpevtgllldlrpvalllvavlhfiedaddpraavaelrea	180
	:.:.*****:*.:.** **** *:*****:*** * * *****:*	
vnz_33670	LAPGSLLLVLTHASYEGIPLSEEQTDGTVGVYRNIRNPLVMRSGAEIGRFFEGTEMVEPGL	240
B7C62_33695	lapgsllvlthasyegiplsreeadgtvgvyrnirnpvmrtreeigaffdgyemvepgl	240
	*****:*.:.*****:*****:*** **:* *****	
vnz_33670	VPMPRWRPESFVE--EEDPYAFSGFAGVGRKA*	270
B7C62_33695	vmpdwrdtplapgqedpyafsgfagvgrka-	272
	* ** *:*.:.: *****	

Abbildung 32: Das Gen *vnz_33670* weist eine hohe prozentuale Identität mit der SAM abhängigen Methyltransferase aus *Kitasatospora albolonga* auf.

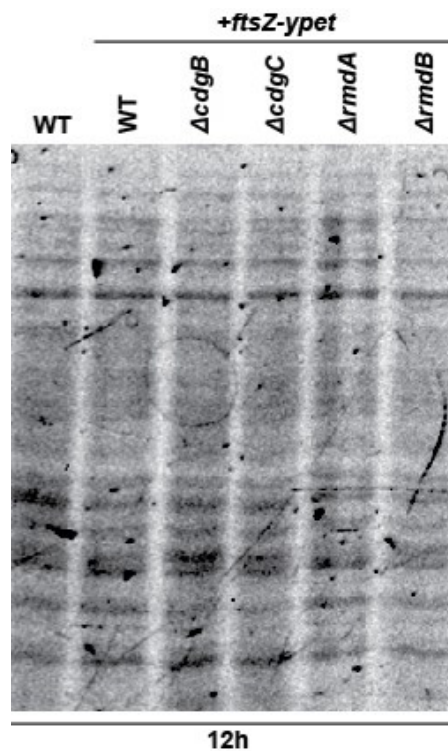


Abbildung 34: Ladekontrolle für den durchgeführten Western Blot mit anschließender Immunodetektion von FtsZ-Ypet. Für jede Probe wurden 14 µg Gesamt-Protein aus den Stämmen *S. venezuelae* WT, WT+ *ftsZ-ypet*, $\Delta rmdA$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta rmdB$ + *ftsZ-ypet* eingesetzt, welche für 12 Stunden in MYM-Medium kultiviert wurden. Die Proteinproben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und per TCE-Färbung sichtbar gemacht. Dieses Experiment wurde von Sara Neumann durchgeführt und enthält auch Proben aus $\Delta cdgB$ + *ftsZ-ypet* und $\Delta cdgC$ + *ftsZ-ypet*.

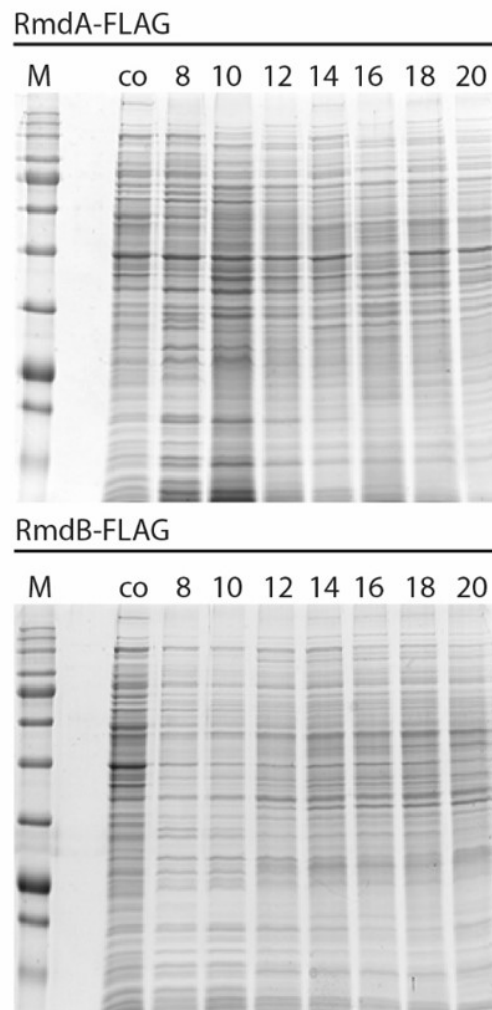


Abbildung 35: Ladekontrolle für die durchgeführten Western Blots mit anschließender Immunodetektion von RmdA-FLAG und RmdB-FLAG. Für die Detektion von RmdA-FLAG wurde je Zeitpunkt 15 µg Gesamtprotein und für RmdB-FLAG 10 µg Gesamtprotein eingesetzt und per SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 20 µg WT-Zelllysate mitgeführt (co).

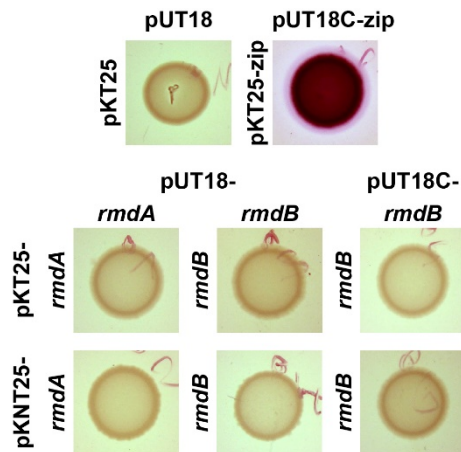


Abbildung 36: RmdA und RmdB zeigen in BTH-Experimenten keine Homodimerisierung. Protein-Protein-Interaktionsstudien mit mittels Wiederherstellung der Adenylatzyklase (CyaA)-Aktivität durch Fusion der Proteine mit CyaA-Untereinheiten T18 bzw. T25 aus *Bordetella pertussis*. Die Tropfcolonien wurden nach 48 Stunden Kultivierung auf MacConkey-Agar, supplementiert mit Maltose, fotografiert. Die Positivkontrolle (pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*) zeigen eine intensive Rotfärbung während die Negativkontrolle (pUT18 –und pKT25 Leervektoren) keine Rotfärbung aufweisen.

VNZ	Gene name	rmdA_wt_fc	rmdB_wt_fc
vnz_15655	<i>bldN</i>	-1,94000811	-0,70151028
vnz_22005	<i>bldM</i>	-1,66601612	-0,86157862
vnz_28820	<i>whil</i>	-1,37037116	-0,8423051

Abbildung 37: Die Gene *bldM*, *bldN* und *whil* sind in Δ *rmdA* signifikant und in Δ *rmdB* nicht signifikant herunterreguliert. Auszüge aus der Transkriptomanalyse, basierend auf isolierter Gesamt-RNA. Gene, welche zweifach ($\log_2 > 1 / < -1$; $p < 0.05$) differenziell reguliert sind, wurden als signifikant betrachtet.

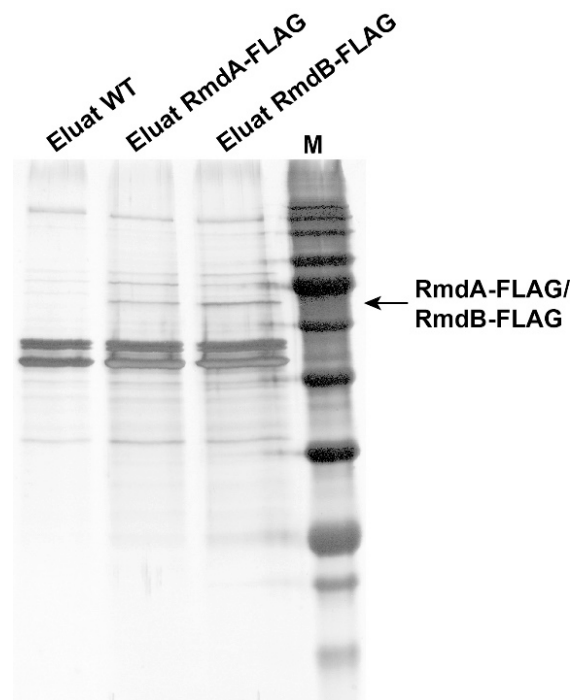


Abbildung 38: Silbernitratfärbung der per SDS-PAGE aufgetrennten Eluatfraktionen nach FLAG-Affinitätschromatografie aus *S. venezuelae* WT, $\Delta rmdA::rmdA$ -FLAG und $\Delta rmdB::rmdB$ -FLAG.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und lediglich auf der Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten habe.

Ich versichere, dass ich mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben habe noch einen entsprechenden Doktorgrad besitze.

Ich versichere, dass diese Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht, angenommen oder abgelehnt wurden.

Ich versichere, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberatern stattfand.

Ich versichere, dass ich die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung zur Kenntnis genommen habe.

.....

Datum / Unterschrift